

Prä-mRNA Splicing in der Spaltheefe *Schizosaccharomyces pombe* :
In vivo **Charakterisierung der Funktion des *srp2* Gens**

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von

Martin Lützelberger

aus Helmstedt

1. Referent: Prof. Dr. Norbert F. Käufer

2. Referent: Prof. Dr. Jürgen Bode

eingereicht am: 22.11.1999

mündliche Prüfung (Disputation) am: 04.02.2000

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch Herrn Prof. Dr. Norbert F. Käufer, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Lützelberger, M., Gross, T. und Norbert F. Käufer (1999). Srp2, a SR protein family member of fission yeast – *in vivo* characterization of its modular domains. *Nucleic Acids Research* (13), 27:2618–2626

Tagungsbeiträge

Lützelberger, M., Schmidt, W., Gross, T. und Norbert F. Käufer (1998). *srp2* of fission yeast encodes a typical SR protein with two RNA binding domains and contains a putative GAR enhancer. *RNA '98 – The 3rd annual meeting of the RNA Society*. 26. – 31. May 1998, University of Wisconsin – Madison, USA.

Lützelberger, M., Gross, T. und Norbert F. Käufer (1998). SR proteins as splicing factors of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. 14. Hammermühle Hefetagung, 15. – 17. Oktober 1998, Ober-Ramstadt, Deutschland.

Lützelberger, M., Gross, T. und Norbert F. Käufer (1999). Srp2, a SR protein family member of fission yeast – *in vivo* characterization of its modular domains. *RNA '99 – The 4th annual meeting of the RNA Society*. 23. – 27. Juni 1999, University of Edinburgh, Scotland.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juli 1996 bis November 1999 am Institut für Genetik der Technischen Universität Braunschweig angefertigt.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Norbert F. Käufer für die Betreuung dieser Arbeit, seinen fachlichen, aber auch persönlichen Einsatz, sowie das mir entgegengebrachte Vertrauen bedanken, ohne das diese Arbeit sicherlich nicht möglich gewesen wäre.

Bei Herrn Professor Dr. Jürgen Bode möchte ich mich für die Übernahme des Koreferates recht herzlich bedanken.

Besonderer Dank gilt Herrn Dr. Thomas Gross, für die anregenden Diskussionen, die vielen nützlichen Tips für die praktische Arbeit, sowie die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Herrn PD Dr. Henning Schmidt danke ich für die Bereitstellung einiger *S.pombe* Stämme und Vektoren, sowie die vielen Ratschläge für die Arbeit mit *S.pombe*.

Für die Hilfe und Mitarbeit bei einigen Experimenten möchte ich Frau Kathrin Richert, Frau Susanne Zock-Emmenthal und insbesondere Frau Wiebke Schmidt meinen Dank aussprechen.

Frau Maria Höxter von der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF) in Braunschweig/Stöckheim danke ich herzlich für die Unterstützung bei der FACS-Analyse der *S.pombe* Zellen.

Dank gilt auch allen Mitarbeitern des Instituts für Genetik, die für eine kontinuierlich gutes Arbeitsklima gesorgt haben.

Nicht zuletzt möchte ich an dieser Stelle meinen Eltern für ihre fortwährende Unterstützung dieser Arbeit meinen Dank aussprechen.

Braunschweig, den 18. November 1999

Martin Lützelberger

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Ziel dieser Arbeit	7
2	Material und Methoden	9
2.1	Geräte	9
2.2	Chemikalien	9
2.3	Medien	11
2.4	Stämme	11
2.4.1	Verwendete <i>S.pombe</i> Stämme	11
2.4.2	Verwendete <i>E.coli</i> Stämme	12
2.5	Für diese Arbeit verwendete Vektoren	13
2.5.1	pUC18/19	13
2.5.2	pREP Vektoren	13
2.5.3	pML1	15
2.5.4	pTG Vektoren	16
2.5.5	pJK148	18
2.6	Verwendete <i>S.pombe</i> Banken	19
2.7	Methoden zur Untersuchung von <i>S.pombe</i>	20
2.7.1	Transformation von <i>S.pombe</i>	20
2.7.2	Isolierung von DNA aus <i>S.pombe</i>	21
2.7.3	Isolierung von RNA aus <i>S.pombe</i>	21
2.7.4	Kreuzungen	22
2.7.5	Herstellung diploider Stämme	22
2.7.6	FACS Analyse von <i>S.pombe</i> Kulturen	22
2.7.7	Indirekte Fluoreszenzmikroskopie und DAPI-Färbung	23
2.7.8	Direkte Fluoreszenz-Mikroskopie	24
2.7.9	Messung der β -Galaktosidase Aktivität in <i>S.pombe</i>	24
2.8	Standard DNA-Methoden	25
2.8.1	Transformation von <i>E.coli</i>	25
2.8.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	25
2.8.3	PCIA-Extraktion und Fällung von DNA	26
2.8.4	Konzentrationsbestimmung von DNA/RNA	26
2.8.5	Spaltung von DNA mit Hilfe von Restriktionsenzymen	26
2.8.6	Klenow-Polymerase Reaktion	26
2.8.7	Dephosphorylierung von DNA	27
2.8.8	Ligation von DNA	27
2.8.9	Agarose-Gelelektrophorese	27
2.8.10	Koloniehybridisierung	28
2.8.11	PCR – Polymerase Chain Reaction	28
2.8.12	Nukleinsäure Hybridisierung	30
2.8.13	DNA Sequenzierung	31
2.9	Isolierung der Domänen von Srp1 und Srp2 mit Hilfe der PCR	32
2.10	Fusion des <i>srp2</i> Gens mit dem <i>lacZ</i> Gen von <i>E.coli</i>	33
2.11	Gerichtete Mutagenese der <i>srp2 cDNA</i>	34
2.12	Differential Display	35
2.12.1	DNase I Behandlung von RNA-Proben	35
2.12.2	Reverse Transkription der Gesamt-RNA	35

2.12.3	DDRT-PCR Reaktion	36
2.12.4	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Polyacrylamidgelen	36
2.12.5	Sequenzen der Oligonukleotide für die DDRT-PCR	36
2.13	Computerunterstützte Methoden	37
3	Ergebnisse	39
3.1	Isolierung von SR-Proteinen aus <i>S.pombe</i>	39
3.1.1	Isolierung der <i>srp2</i> cDNA	40
3.1.2	Isolierung des <i>srp2</i> Gens	42
3.1.3	Das <i>srp2</i> Gen besteht aus 10 Exons und 9 Introns	42
3.2	Gene-Disruption von <i>srp2</i>	43
3.2.1	Herstellung eines Konstrukts für das Gene-Disruption	43
3.2.2	Das <i>srp2</i> Gen ist für das mitotische Wachstum von <i>S.pombe</i> essentiell	43
3.3	Srp2 ist ein Kernprotein	45
3.3.1	Fusion von Srp2 mit dem Green Fluorescent Protein	46
3.3.2	Fusion der einzelnen Domänen von Srp2 mit dem GFP	47
3.3.3	Die argininreiche Domäne von Srp2 enthält ein Kerntransportsignal	47
3.3.4	Die SR-Dipeptid Elemente der argininreichen Domäne haben die Funktion eines Kerntransportsignals	48
3.4	Überexpression des <i>srp2</i> Gens in <i>S.pombe</i>	49
3.4.1	Die Überexpression der ersten RNA-Bindungsdomäne von Srp2 führt nicht zur Akkumulation von prä-mRNA	52
3.4.2	Die zweite RNA-Bindungsdomäne von Srp2 verändert die Funktion der RNA-Bindungsdomäne von Srp1	53
3.5	Herstellung eines konditional letalen <i>srp2</i> Stamms	55
3.6	Charakterisierung des konditional letalen <i>srp2</i> Stamms	58
3.6.1	FACS-Analyse des konditional letalen <i>srp2</i> Stamms	60
3.6.2	Der konditional letale <i>srp2</i> Stamm akkumuliert keine <i>tfl1d</i> prä-mRNA	62
3.7	Komplementierung des konditional letalen <i>srp2</i> Stamms	64
3.7.1	Herstellung eines Expressionsvektors mit dem Promotor des <i>srp2</i> Gens	64
3.7.2	Die RNA-Bindungsdomäne von Srp1 kann die Funktion der ersten RNA-Bindungsdomäne von Srp2 ersetzen	66
3.7.3	Gerichtete Mutagenese der <i>srp2</i> cDNA	66
3.8	Wird Srp2 für das Spleißen einer spezifischen prä-mRNA benötigt?	69
3.9	Das Exon 6 von <i>srp2</i> enthält eine mögliche Splicing Enhancer Sequenz	72
4	Diskussion	79
4.1	Die Spaltheife <i>Schizosaccharomyces pombe</i> besitzt ein weiteres SR-Protein	79
4.2	Welche Funktion haben die einzelnen Domänen von Srp2 <i>in vivo</i> ?	79
4.3	Wird Srp2 für das Spleißen einer spezifischen prä-mRNA benötigt?	84
4.4	Wird das Spleißen von prä-mRNA in <i>S.pombe</i> von SR-Proteinen reguliert?	84
5	Zusammenfassung	87
6	Literaturverzeichnis	89
7	Anhang	97
7.1	Sequenzen	97
7.1.1	Sequenz der <i>srp2</i> cDNA	97
7.1.2	Sequenz des <i>srp2</i> Gens	97

ABKÜRZUNGEN

5'-SS	5'-Spleißstelle
3'-SS	3'-Spleißstelle
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
ddNTP	2',3'-Dideoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
dNTP	2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendinitrilotetraacetat
EtOH	Ethanol
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
GFP	Green Fluorescent Protein
h	Stunde(n)
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktosid
kb	Kilobase(n)
LiDS	Lithiumdodecylsulfat
NaAc	Natriumacetat
min	Minute(n)
nt	Nucleotid(e)
OD	Optische Dichte
ORF	Open Reading Frame
PCIA	Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	Polyethylenglykol
Pipes	Piperazine-N,N'-bis(2-Ethansulfonsäure)
RBD	RNA-Bindungsdomäne
RRD	argininreiche Domäne
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Standard Natriumcitrat
snRNA	small nuclear RNA
snRNP	small nuclear ribonucleoprotein particle
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
Upm	Umdrehungen pro Minute
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktosid

1 Einleitung

Die Gene von eukaryontischen Organismen haben eine mosaikartige Struktur. Die kodierenden Sequenzen ihrer Gene können von ein oder mehreren nicht-kodierenden Abschnitten unterbrochen sein, die als Introns bezeichnet werden. Bei der Transkription dieser Gene entsteht ein primäres Transkript, die sogenannte prä-mRNA. Nach der Transkription werden die Introns aus der prä-mRNA entfernt und die kodierenden Sequenzen, die sogenannten Exons, miteinander verbunden. Dieser Vorgang wird als prä-mRNA Spleißen bezeichnet.

Das Herausspleißen der Introns findet im Zellkern statt. Weil die meisten eukaryontischen Gene Introns enthalten, ist das Entfernen der Introns ein essentieller Vorgang, um eine reife mRNA zu bilden, die schließlich aus dem Zellkern in das Cytoplasma exportiert und für die Translation verwendet wird.

Für das Spleißen der prä-mRNA besitzt die eukaryotische Zelle einen Ribonukleoproteinkomplex, der sich aus über 100 verschiedenen Proteinen und fünf kleinen RNA-Molekülen, den sogenannten snRNAs (small nuclear RNAs), zusammensetzt (McKeown, 1993, Newman, 1994). Die Proteine und snRNAs bilden kleine Ribonukleoproteinpartikel, die als snRNPs (small nuclear ribonucleoprotein particle) bezeichnet werden (Lamm & Lamond, 1993). Fünf dieser snRNPs, (snRNP U1, U2, U4/U6 und U5) lagern sich auf der prä-mRNA zu einer komplexen Struktur, dem Spleißosom, zusammen (Lamond, 1993, Zieve & Sauterer, 1990).

Die snRNPs sorgen für die Erkennung und das Herausspleißen der Introns, indem sie an kurze konservierte Sequenzabschnitte der prä-mRNA binden: Diese Sequenzen liegen an den Grenzen zwischen den Exons und Introns und werden als 5'- und 3'-Spleißstellen bezeichnet. In höheren Eukaryonten sind jeweils nur die ersten und die letzten beiden Nukleotide der 5'- (GTRAGU) und der 3'-Spleißstelle (YAG) des Introns konserviert.

Ein weiteres Element, das von den snRNPs erkannt wird, ist ein Adenosin-Nukleotid, das bei der Spleißreaktion als Verzweigungsstelle (Branchpoint) dient. Der Branchpoint ist von der Konsensussequenz YNCURAC umgeben und befindet sich in der Regel etwa 20–40 Nukleotide vor der 3'-Spleißstelle. In dieser Region enthalten die Introns von höheren Eukaryonten häufig pyrimidinreiche Sequenzen (Coolidge *et al.*, 1997).

Durch die sukzessive Bindung der snRNPs an die Spleißstellen wird das Spleißosom auf der prä-mRNA aufgebaut. Dabei binden die snRNAs zum Teil durch komplementäre Basenpaarung an die Spleißstellen der Introns. Durch eine Serie von Konformationsänderungen wird die prä-mRNA in eine für die Spleißreaktion geeignete Sekundärstruktur gebracht, wobei die 5'- und die 3'-Spleißstellen der Introns in räumliche Nähe gelangen (Reed, 1996).

Der Aufbau des Spleißosoms auf der prä-mRNA erfolgt in mehreren Phasen und beginnt mit der Bindung des snRNP U1 an die 5'-Spleißstelle (Abb.1.1; Komplex E). Die U1 snRNA bindet dabei durch komplementäre Basenpaarung an die prä-mRNA.

Die Bildung des Spleißosoms wird durch die Bindung des snRNP U2 an die Verzweigungsstelle fortgesetzt, wobei die U2 snRNA durch komplementäre Basenpaarung mit der Verzweigungsstelle in Wechselwirkung tritt (Abb.1.1; Komplex A). Durch die Bindung der snRNPs U4/U6 und U5 in Form eines Tri-snRNP Komplexes wird die Spleißreaktion eingeleitet (Abb.1.1; Komplex B).

Durch eine Reihe von Konformationsänderungen, für die ATP benötigt wird, kommt es zur Bildung des katalytisch aktiven Spleißosoms (Abb.1.1; Komplex C). Dabei wird die ausgedehnte Basenpaarung zwischen der U4 und der U6 snRNA, sowie der U1 snRNA mit der 5'-Spleißstelle aufgehoben und eine neue Paarung zwischen der U2 und der U6

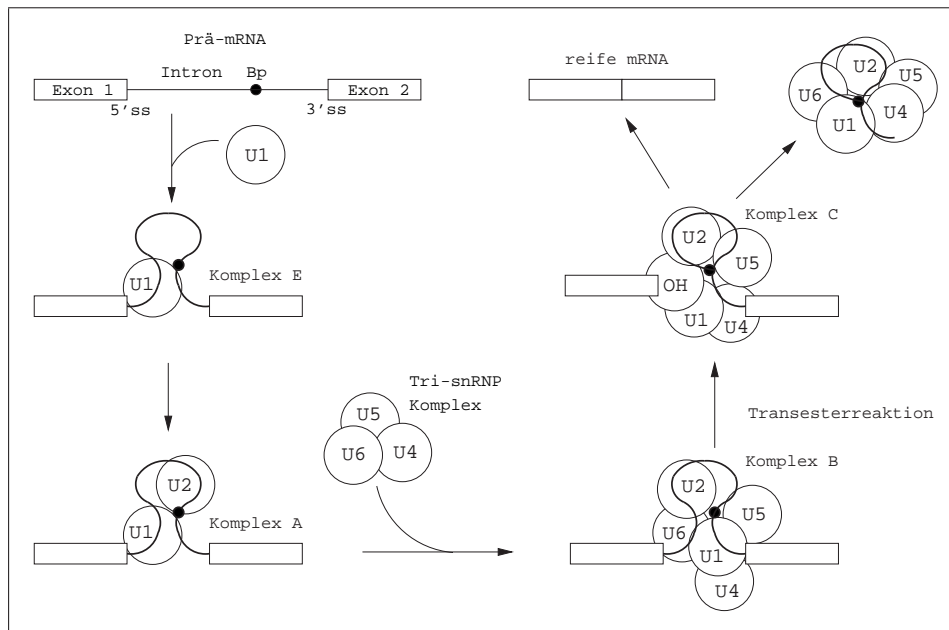


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der sukzessiven Bindung der snRNP Partikel an die prä-mRNA. Die Spleißreaktion wird durch die Bindung des snRNP U1 an die prä-mRNA eingeleitet. Dabei gelangt die 5'- und die 3'- Spleißstelle des Introns in räumliche Nähe. Die Erkennung der Verzweigungsstelle geschieht durch die Bindung des snRNP U2 mit Hilfe einer komplementären Basenpaarung zwischen der U2 snRNA und der Branchsequenz. Durch die Bindung des [U4/U6.U5] Tri-snRNP Komplexes wird die erste Transesterreaktion eingeleitet. Dabei kommt es zur Spaltung der Phosphodiesterbindung an der 5'-Spleißstelle und zur Vernüpfung des 5'-Endes des Introns mit einem Adenosin-Baustein in der Branch-Sequenz über eine 2',5'-Phosphodiesterbindung. Nach diesem Schritt werden die beiden Exons durch den nucleophilen Angriff des 3'-OH Endes des 5'-gelegenen Exons (Exon 1) auf die 3'-Spleißstelle miteinander verknüpft und das Intron in Form einer Lassostruktur freigesetzt. Es bedeuten: 5'-SS, 5'-Spleißstelle; 3'-SS, 3'-Spleißstelle; Bp, Branchpoint.

snRNA mit der Branchsequenz und der 5'-Spleißstelle aufgebaut (Madhani & Guthrie, 1994, Nilsen, 1994, Wu & Manley, 1991).

Nun kann der erste Schritt der Spleißreaktion erfolgen, die in höheren und niederen Eukaryonten nach dem gleichen Mechanismus abläuft und aus zwei aufeinander folgenden Transesterreaktionen besteht (Sharp, 1994): Bei der ersten Transesterreaktion wird die 3',5'-Phosphodiester-Bindung zwischen dem Exon und dem Intron an der 5'-Spleißstelle gespalten. Das 5'-Ende des Introns wird mit der 2'-OH Gruppe des Adenosins an der Verzweigungsstelle verknüpft, so daß eine 2',5'-Phosphodiester-Bindung gebildet wird (Abb.1.2, 2). Dabei entsteht ein lassoähnliches Zwischenprodukt, das man als Lariat bezeichnet, sowie ein Exon mit einer freien 3'-OH Gruppe. Es wird diskutiert, daß die snRNAs U2 und U6 dabei das aktive Zentrum des Spleißosoms bilden, das diese Reaktion katalysiert (Sun & Manley, 1995, Umen & Guthrie, 1995).

Beim zweiten Schritt der Spleißreaktion werden die Exons durch eine weitere Transesterreaktion miteinander verbunden. Es kommt dabei zur Spaltung der 3',5'-Phosphodiester-Bindung an der 3'-Spleißstelle, wobei das Intron in Form des Lariats freigesetzt wird (Abb.1.2, 3).

Das Herauspleißen der Introns aus der prä-mRNA muß mit großer Präzision erfolgen. Die Introns müssen bis auf das Nukleotid genau aus der prä-mRNA herausgeschnitten und die Exons präzise miteinander verbunden werden, weil sonst die Abfolge der Codons gestört und das Leseraster der mRNA verändert wird. Welche Folgen das fehlerhafte Spleißen von prä-mRNA haben kann, zeigen z. B. einige genetisch bedingte Krankheiten

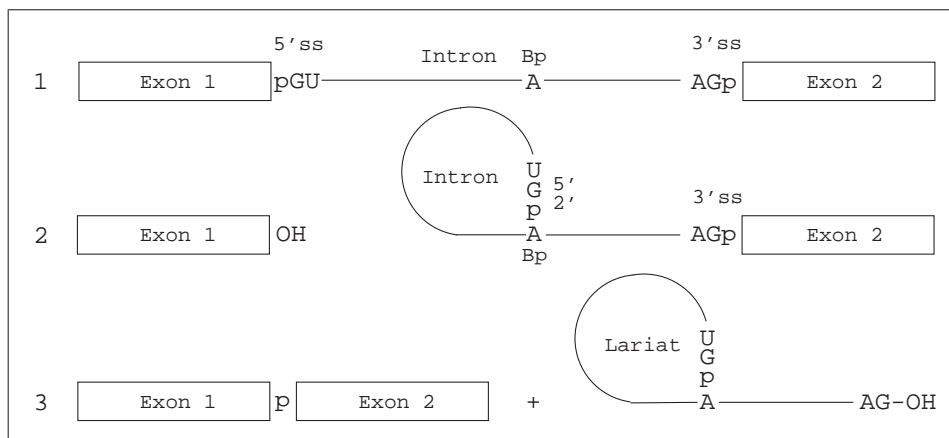


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Transesterreaktionen der Spleißreaktion. Es bedeuten: 5'-SS, 5'-Spleißstelle; 3'-SS, 3'-Spleißstelle; Bp, Branchpoint.

beim Menschen, die auf die Mutation von Spleißstellen zurückzuführen sind (Cooper & Mattox, 1997).

Weil sich die Spleißstellen der Introns nur aus sehr kurzen konservierten Sequenzen zusammensetzen, werden für die präzise Erkennung der Spleißstellen weitere Spleißfaktoren benötigt, welche die snRNPs bei der Erkennung der Introns unterstützen und die Spleißreaktion regulieren (Lamm & Lamond, 1993). Häufig sind diese Spleißfaktoren RNA-bindende Proteine, die neben den Spleißstellen noch andere Sequenzelemente der Introns erkennen:

Zum Beispiel bindet der Spleißfaktor U2AF (snRNP U2 auxiliary factor), der sich aus zwei Untereinheiten von 35 und 65 kDa zusammensetzt (U2AF³⁵/U2AF⁶⁵), an die pyrimidinreiche Sequenz, die sich in manchen Introns zwischen der Verzweigungsstelle und der 3'-Spleißstelle befindet. Dadurch wird die Bindung des snRNP U2 an die Verzweigungsstelle gefördert (Ruskin *et al.*, 1988, Valcarel *et al.*, 1996).

Zu einer bedeutenden Gruppe von RNA-bindenden Spleißfaktoren gehören die SR-Proteine (Fu, 1995, Manley & Tacke, 1996, Valcarel & Green, 1996, Will & Lührmann, 1997, Zahler *et al.*, 1992). Die SR-Proteine sind essentielle Spleißfaktoren, die für das konstitutive und alternative Spleißen von prä-mRNA erforderlich sind.

Der aminoterminal Teil der SR-Proteine besteht aus ein oder zwei RNA-Bindungsdomänen (RBDs), die jeweils ein RNA-Erkennungsmotiv (RRM) enthalten. Die RNA-Erkennungsmotive der RNA-Bindungsdomäne sind aus vier antiparallelen β -Faltblattstrukturen und zwei α -Helices aufgebaut, die in der Reihenfolge $\beta_1\alpha_1\beta_2\beta_3\alpha_2\beta_4$ angeordnet sind.

Die β_3 - und β_1 -Faltblattstrukturen enthalten konservierte Sequenzmotive aus acht bzw. sieben Aminosäuren, die als RNP-1 und RNP-2 Motiv bezeichnet werden und für die Bindung der RNA erforderlich sind (Caceres & Krainer, 1993). Des weiteren folgt auf das RNP-1 Motiv der ersten RNA-Bindungsdomäne die konservierte Sequenz EFEDXRDA. Die SR-Proteine, die eine zweite RNA-Bindungsdomäne besitzen, enthalten eine charakteristische Signatursequenz (SWQDLKD), die absolut invariabel ist (Birney *et al.*, 1993).

Der carboxyterminale Teil der SR-Proteine besteht aus einer Domäne, die reich an alternierenden Serin/Arginin-Dipeptiden ist. Die Länge dieser SR-Domäne und die Menge der RS-Dipeptide variiert in den verschiedenen SR-Proteinen. So enthält der Spleißfaktor ASF/SF2 z. B. 13 und das SR-Protein SRp30c 5 SR-Dipeptide (Screaton *et al.*, 1995).

Die Funktion der SR-Proteine wurde hauptsächlich *in vitro* mit Hilfe von cytoplasmatischen S100 Extrakten aus HeLa Zellen untersucht. Diese Extrakte enthalten alle Bestandteile, die für das *in vitro* Spleißen von prä-mRNA erforderlich sind, aber nur eine geringe Konzentration von SR-Proteinen. Diese müssen gesondert hinzugefügt werden, damit die

Extrakte Spleißaktivität besitzen (Krainer *et al.*, 1990, Zahler *et al.*, 1992). Auch *in vivo* konnte gezeigt werden, daß SR-Proteine essentielle Spleißfaktoren sind (Mount, 1997, Ring & Lis, 1994, Wang *et al.*, 1996).

Untersuchungen mit dem Two-Hybrid System haben ergeben, daß die SR-Proteine mit Hilfe der RS-Domäne an die snRNPs und andere Spleißfaktoren binden. Zum Beispiel interagieren die SR-Proteine ASF/SF2 und SC35 mit dem Spleißfaktor U2AF³⁵ und dem Protein U1-70K, das spezifisch am snRNP U1 gebunden ist. Es wird diskutiert, daß auf diese Weise ein komplexes Netzwerk von Protein-Protein Interaktionen entsteht, mit dem der Kontakt zwischen der 5'- und 3'- Spleißstelle hergestellt wird (Wu & Maniatis, 1993).

Die Beobachtung, daß die SR-Proteine bereits an der prä-mRNA gebunden sind, noch bevor das snRNP U1 mit der 5'-Spleißstelle interagiert, führte zu der Annahme, daß die Erkennung der Spleißstellen durch die SR-Proteine gefördert wird (Buvioli *et al.*, 1997, Staknis & Reed, 1994, Zahler & Roth, 1995).

So wurde z. B. gezeigt, daß der Spleißfaktor ASF/SF2 *in vitro* an die 5'-Spleißstellen von verschiedenen prä-mRNAs bindet (Zuo & Manley, 1994). Wenn *in vitro* besonders hohe Konzentrationen von ASF/SF2 eingesetzt werden, kann die Spleißreaktion sogar in Abwesenheit des snRNP U1 erfolgen (Tarn & Steitz, 1994). Das bedeutet, daß durch die Bindung der SR-Proteine die Spleißstellen erkannt und festgelegt werden.

Durch die Bindung der SR-Proteine an die prä-mRNA kann auch die Auswahl von alternativen Spleißstellen erfolgen (Chabot, 1996). Beim alternativen Spleißen werden die Exons einer prä-mRNA auf unterschiedliche Weise miteinander verknüpft, so daß aus einem Transkript mehrere mRNAs gebildet werden können, die für verschiedene Isoformen eines Proteins kodieren.

Die Auswahl der alternativen Spleißstellen ist von der Konzentration der SR-Proteine abhängig: Wenn z. B. die Spleißfaktoren ASF/SF2 und SC35 bei einer *in vitro* Spleißreaktion in steigender Menge zu einer prä-mRNA mit zwei alternativen 5'-Spleißstellen gegeben werden, dann wird beim Spleißen die proximale d. h. stromabwärts gelegene 5'-Spleißstelle bevorzugt verwendet (Ge & Manley, 1990, Horowitz & Krainer, 1994). Die Zugabe des hnRNP Proteins A1 hat den gegenteiligen Effekt: Statt der proximalen 5'-Spleißstelle wird die distale d. h. stromaufwärts gelegene Spleißstelle verwendet (Gatto-Konczak *et al.*, 1999). Das A1 Protein gehört zu der Gruppe der hnRNPs (heterogenous nuclear ribonucleoprotein particle). Das sind RNA-bindende Proteine, die mehrere RNA-Bindungsdomänen haben können, aber keine RS-Domäne besitzen. Sie können wie die SR-Proteine an prä-mRNA binden (Birney *et al.*, 1993).

Außer den Spleißstellen kommen in der prä-mRNA weitere Sequenzelemente vor, die als Bindungsstellen der SR-Proteine dienen. Diese Sequenzelemente können das Spleißen von prä-mRNA hemmen oder fördern. Sie werden deshalb als Splicing Silencer- oder Enhancer Sequenzen bezeichnet.

Splicing Enhancer setzen sich in der Regel aus kurzen purinreichen und manchmal auch pyrimidinreichen Sequenzen zusammen (Schaal & Maniatis, 1999). Sie wurden sowohl in Exons als auch in Introns identifiziert. Durch die Bindung von SR-Proteinen können sie das Spleißen von benachbarten Introns oder Exons beeinflussen.

Sie treten insbesondere in der Nähe von Introns auf, deren Spleißstellen von der Konsensussequenz abweichen. Die Bindung der SR-Proteine an die Enhancer Sequenzen bewirkt, daß die snRNPs in die Nähe der Spleißstellen gelangen, so daß das Herausspleißen dieser Introns gefördert wird (Hertel *et al.*, 1997). Oft befinden sich Splicing Enhancer in prä-mRNAs die alternativ gespleißt werden. Es wird diskutiert, daß durch die sequenzspezifische Bindung von SR-Proteinen an bestimmte Splicing Enhancer Elemente das alternative Spleißen reguliert wird. Ein Beispiel dafür ist die geschlechtsspezifische Differenzierung von *Drosophila*, die durch das *sxl* Gen und die beiden SR-Proteine TRA und TRA2 reguliert wird (Chabot, 1996, Gebauer *et al.*, 1998). Ein Schema dieser Regulation zeigt die Abb.1.3.

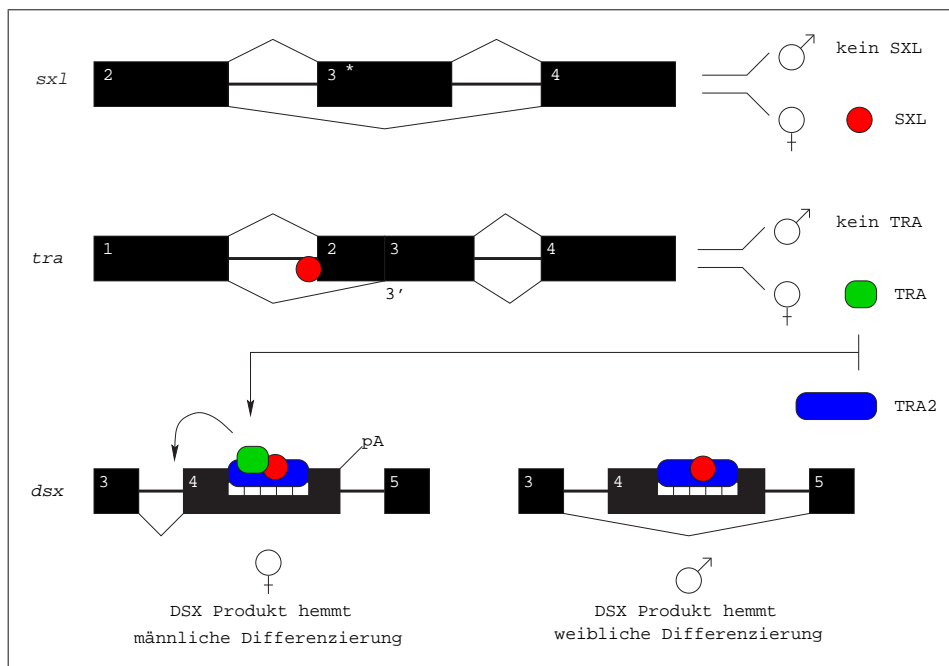


Abb. 1.3: Schema der Regulation der geschlechtsspezifischen Differenzierung von *Drosophila* durch alternatives Spleißen. Das Exon 3 des *sxl* Gens enthält ein Stopcodon (*). Deshalb kann das SXL Protein nur in weiblichen Zellen gebildet werden. Das SXL Protein bindet an die 3'-Spleißstelle von Exon 2 der *tra* mRNA. Dadurch wird die Bindung des Spleißfaktors U2AF⁶⁵ verhindert und führt zur Aktivierung einer stromabwärts gelegenen 3'-Spleißstelle (3'), so daß das TRA Protein gebildet wird. Das TRA Protein stabilisiert die Bindung des TRA2 Proteins an einen Splicing Enhancer in Exon 4 der *dsx* prä-mRNA, so daß eine stromaufwärts gelegene 3'-Spleißstelle erkannt wird. Das „weibliche“ DSX Produkt verhindert die Expression von „männlichen“ Genen. Das 3'-Ende von Exon 4 hat keine benachbarte 5'-Spleißstelle. Stattdessen befindet sich dort eine Polyadenylierungsstelle (pA), die für die Prozessierung der „weiblichen“ mRNA benötigt wird. Es sind jeweils nur die Abschnitte der *sxl*, *tra* und *dsx* prä-mRNAs gezeigt, die alternativ gespleißt werden. (Abbildung nach Chabot (1996), verändert)

Dieses Beispiel verdeutlicht, daß das alternative Spleißen von prä-mRNA durch die unterschiedliche Expression der SR-Proteine in verschiedenen Zell- und Gewebetypen gesteuert wird (Fu, 1995). Untersuchungen haben ergeben, daß der Spleißfaktor ASF/SF2 und das hnRNP Protein A1 aus dem Menschen in verschiedenen Geweben unterschiedlich stark exprimiert wird (Hanamura *et al.*, 1998).

Aber nicht nur die Expression der SR-Proteine wird von der Zelle gesteuert, sondern auch die Aktivität der SR-Proteine wird reguliert: Die SR-Proteine sind Phosphoproteine. Sie werden an den Serin-Resten der SR-Dipeptide der SR-Domäne phosphoryliert (Colwill *et al.*, 1996a). *In vitro* konnte gezeigt werden, daß die Phosphorylierung der SR-Proteine für den Ablauf der Spleißreaktion essentiell ist. So können SR-Proteine, deren SR-Domäne deletiert wurde HeLa S100 Extrakte nicht mehr komplementieren (Cao *et al.*, 1997). Darüber hinaus wurde gezeigt, daß der Grad der Phosphorylierung über die Aktivität der SR-Proteine bestimmt, denn sowohl hypo- als auch hyperphosphorylierte SR-Proteine hemmen die Spleißreaktion *in vitro* (Kanopka *et al.*, 1998, Prasad *et al.*, 1999).

Aus dem Menschen wurden mehrere Proteinkinasen isoliert, welche die SR-Dipeptide von SR-Proteinen *in vitro* spezifisch phosphorylieren können. Dazu gehören z. B. die Kinasen SRPK1 und SRPK2, die Kinase CLK/Sty1 und die Kinasen CLK2 und CLK3 (Colwill *et al.*, 1996a,b, Duncan *et al.*, 1997, 1998). *In vivo* spielen sie eine wichtige Rolle bei der Regulation der subnukleären Lokalisation der SR-Proteine:

Die SR-Proteine sind Kernproteine. Sie sind in subnukleären Strukturen lokalisiert, die als „Nuclear Speckles“ bezeichnet werden (Misteli *et al.*, 1997). Die „Nuclear Speckles“ dienen der Zelle vermutlich als Speicherorte für SR-Proteine und andere Spleißfaktoren. Bei der Überexpression der Kinasen SRPK1 und Clk/Sty1 in HeLa Zellen kommt es zur Auflösung der „Nuclear Speckles“, wobei sich die SR-Proteine homogen im Zellkern verteilen (Koizumi *et al.*, 1999, Kuroyanagi *et al.*, 1998).

Die Dephosphorylierung der SR-Proteine hat den gegenteiligen Effekt. Sie wird z. B. bei der Infektion von HeLa Zellen mit dem Adenovirus beobachtet, und führt dazu, daß sich die SR-Proteine in den „Nuclear Speckles“ anhäufen und die Spleißreaktion gehemmt wird (Kanopka *et al.*, 1998). Deshalb wird angenommen, daß die Phosphorylierung ein Signal ist, das die SR-Proteine aus den Speckles dissoziieren läßt (Gui *et al.*, 1994a,b). Das zeigt, daß die reversible Phosphorylierung der SR-Proteine ein wichtiger Mechanismus ist, um die Spleißreaktion zu regulieren.

Eine weitere Möglichkeit der Regulation ist das alternative Spleißen der SR-Proteine. So wurden z. B. alternativ gespleißte cDNAs der Spleißfaktoren SRp20, SRp40 und ASF/SF2 isoliert, die für verkürzte Formen dieser Proteine kodieren und nur noch aus den RNA-Bindungsdomänen bestehen (Du & Taub, 1997, Jumaa & Nielsen, 1997, Popielarz *et al.*, 1995). Einige dieser Isoformen werden gewebespezifisch exprimiert. Welche Funktion diese verkürzten Proteine haben, konnte bisher nicht geklärt werden. Vermutlich hat das alternative Spleißen der SR-Proteine eine autoregulatorische Funktion, mit deren Hilfe die Konzentration der SR-Proteine in der Zelle gesteuert wird (Jumaa & Nielsen, 1997).

Diese Beispiele verdeutlichen mit welcher großer Komplexität das Spleißen von prä-mRNA in höheren Eukaryonten reguliert wird. Daher wurde die Funktion vieler Spleißfaktoren hauptsächlich *in vitro* untersucht, so daß nur wenig über ihre Funktion *in vivo* bekannt ist. Aus diesem Grund hat man damit begonnen, durch die Verwendung von einfachen Modellorganismen, wie z. B. der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*, den Spleißapparat genetisch zu charakterisieren:

Durch die Isolierung von zahlreichen PRP (pre-mRNA processing) Mutanten ist es gelungen viele Spleißfaktoren zu identifizieren, die für das Spleißen von prä-mRNA essentiell sind. Auf diese Weise wurden viele Gemeinsamkeiten aber auch Unterschiede zwischen dem Spleißapparat von niederen und höheren Eukaryonten aufgedeckt.

Es wird diskutiert, daß diese Differenzen hauptsächlich durch die Struktur der Introns bedingt sind: Das Genom von *S.cerevisiae* wurde mittlerweile vollständig sequenziert. Bei der Analyse der Sequenzen wurde festgestellt, daß nur etwa 4 % der ca. 6.000 Gene von Introns unterbrochen sind. Die Auswertung von 228 Intronsequenzen hat ergeben, daß die meisten Introns mit der Sequenz AAAG/GTATGTT beginnen, an der Verzweigungsstelle die Sequenz TTTACTAACAA haben, und eine 3'-Spleißstelle mit der Sequenz AYAG besitzen. Zwischen der Verzweigungsstelle und der 3'-Spleißstelle liegt in den meisten Introns eine pyrimidinreiche Region. Das zeigt, daß die Spleißstellen der Introns von *S.cerevisiae* wesentlich stärker konserviert sind als in höheren Eukaryonten. Außerdem befinden sich die Introns meistens am 5'-Ende der Gene und kommen in der Regel nur einzeln vor. Insgesamt wurden nur vier Gene identifiziert, die zwei Introns enthalten (Spingola *et al.*, 1999).

Die Spaltheife *Schizosaccharomyces pombe* wird ebenfalls als Modellorganismus für die Untersuchung des eukaryontischen Spleißapparats verwendet. Bis heute wurden etwa 16 prp Mutanten isoliert, die einen Defekt beim prä-mRNA Spleißen zeigen (Potashkin *et al.*, 1993, Urushiyama *et al.*, 1996). Durch die Komplementierung der temperatursensitiven prp Mutanten konnten bereits einige Gene isoliert werden, die große Ähnlichkeit mit den Spleißfaktoren aus höheren Eukaryonten haben (Porter *et al.*, 1990, Romfo *et al.*, 1999).

Etwa 40 % der Gene von *S.pombe* enthalten Introns, die eine Größe von durchschnittlich 40–120 bp besitzen. Bei der Untersuchung dieser Introns wurde festgestellt, daß deren Spleißstellen den Konsensussequenzen der höheren Eukaryonten sehr ähnlich sind (Prabhala *et al.*, 1992). Sehr viele *S.pombe* Gene werden von multiplen Introns unterbrochen.

Der Spleißapparat von *S.pombe* scheint dem der höheren Eukaryonten sehr ähnlich zu sein, denn es konnte gezeigt werden, daß Säuger-Introns von *S.pombe* sogar *in vivo* gespleißt werden können (Kaeufer *et al.*, 1985).

Darüber hinaus wurden verschiedene Spleißfaktoren identifiziert, die auch in höheren Eukaryonten eine wichtige Rolle bei der Regulation der Spleißreaktion spielen: So wurde z. B. durch die Komplementierung eines temperatursensitiven *S.pombe* Stamms die Serin/Threonin Proteinkinase Prp4 isoliert. Prp4 ist die erste Kinase, der eine Funktion beim Spleißen von prä-mRNA nachgewiesen werden konnte (Alahari *et al.*, 1993, Rosenberg *et al.*, 1991). In höheren Eukaryonten kommt ein mögliches Homolog dieser Kinase vor, das in der Lage ist, die RS-Domäne des Spleißfaktors ASF/SF2 *in vitro* zu phosphorylieren (Gross *et al.*, 1997).

Auch die Kinase Dsk1 von *S.pombe* phosphoryliert SR-Proteine: Dies wurde am Beispiel des Spleißfaktors ASF/SF2 und der großen Untereinheit des Spleißfaktors U2AF⁶⁵ gezeigt (Tang *et al.*, 1998). Die Dsk1 Kinase ist mit den Serin/Threonin Protein Kinasen SRPK1 und SRPK2 aus dem Menschen verwandt. Doch bisher konnten die *in vivo* Substrate der Dsk1 und der Prp4 Kinase noch nicht identifiziert werden.

Aus dem Menschen kennt man bis heute neun verschiedene SR-Proteine, die das konstitutive und alternative Spleißen von prä-mRNA regulieren (Zahler *et al.*, 1992). Aufgrund von vergleichenden Untersuchungen von Datenbanksequenzen wurde noch bis vor kurzem angenommen, daß SR-Proteine nur in vielzelligen Lebewesen vorkommen, aber nicht in der Hefe vorhanden sind.

Doch die Isolierung des *srp1* Gens hat gezeigt, daß in der Spaltheife *Schizosaccharomyces pombe* SR-Proteine vorkommen (Gross *et al.*, 1998). Das *srp1* Gen kodiert für das erste RNA-bindende Protein mit einer SR-Domäne, das in einem einzelligen Lebewesen gefunden wurde. Srp1 besteht aus einer aminoterminalen RNA-Bindungsdomäne, einer RS-Domäne und einer carboxyterminale Domäne von unbekannter Funktion und hat große Ähnlichkeit mit den SR-Proteinen aus dem Menschen. *In vivo* Untersuchungen haben ergeben, daß Srp1 in *S.pombe* am Spleißen von prä-mRNA beteiligt ist (Gross *et al.*, 1998).

Die Präsenz der Serin/Threonin Proteinkinasen Prp4 und Dsk1 sowie des Spleißfaktors Srp1 deutet darauf hin, daß das Spleißen von prä-mRNA in *S.pombe* auf ähnliche Weise reguliert sein könnte wie in höheren Eukaryonten. Das macht die Spaltheife zu einem attraktiven Modellorganismus für die genetische Untersuchung dieser Spleißfaktoren.

1.1 Ziel dieser Arbeit

Trotz großer Fortschritte bei der Aufklärung der Prozesse, die das Spleißen von prä-mRNA regulieren, ist die Funktion vieler Spleißfaktoren immer noch ungeklärt und gibt Anlaß zu Spekulationen. Insbesondere ist über die Funktion der SR-Proteine *in vivo* nur wenig bekannt.

Die Isolierung von SR-Proteinen aus der Spaltheife eröffnet die Möglichkeit die Funktion dieser Proteine *in vivo* zu untersuchen. Das könnte dazu beitragen, die Mechanismen aufzuklären, mit deren Hilfe das Spleißen von prä-mRNA reguliert wird.

Das Ziel dieser Arbeit ist daher die Isolierung von weiteren SR-Proteinen aus der Spaltheife, um deren Funktion beim Spleißen von prä-mRNA *in vivo* näher zu charakterisieren.

2 Material und Methoden

Die in dieser Arbeit beschriebenen Klonierungsarbeiten wurden gemäß den Bestimmungen des Gentechnikgesetzes (GenTG) vom 20.06.90 durchgeführt.

2.1 Geräte

Tab. 2.1: Verwendete Geräte

Geräte	Hersteller
Agarosegel-Apparatur	BRL
Autoradiographie Kassetten 13×18, 35×43	Rego
Blockthermostat BT100	Kleinfeldt Labortechnik
Gel-Dokumentation	Phase
Geltrockner, Modell 583	Biorad
Gilson Pipetten P10, P20, P200, P1000, P5000	Gilson
Hoch-Vakuumpumpe E2 M5	Edwards
Hybridisierungssofen 400 HY	Bachhofer
Kühlzentrifuge RC5C	Sorvall
Labormikroskop, Axioplan 2	Zeiss
Labor-Tischzentrifuge	Heraeus
Laborzentrifuge Megafuge 1.0	Heraeus
Magnetrührer	Omnilab
Membran-Vakuumpumpe MP18N	Saur
Mikromanipulator Singer MSM System	Singer
Netzgeräte	Phase
Peristaltik Pumpe LKB P1	Pharmacia
Rotoren: SS34, GSA, GS3, HB4	Sorvall
Reagenzglas-Schüttelgerät	Infors
Reagenzglas-Schüttelgerät, Rotomix	Neolab
Reaktionsgefäß Schüttelgerät, 2× ³	Velp Scientifica
Reaktionsgefäß Schüttelgerät, Fastprep FP120	Savant
Sequenzgel-Apparatur Model S2	BRL
Spektralphotometer DU-530	Beckman
Standard Labormikroskop	Zeiss
Taumlgerät Modell 3012	GFL
Thermostat Modell F10	Julabo
Thermocycler Hybaid	MWG-Biotech
Tischzentrifuge Biofuge 13	Heraeus
Tischzentrifuge fresco	Heraeus
Vakuumkonzentrator, SpeedVac plus SC110A	Savant
Wasserbad Modell U3	Julabo

2.2 Chemikalien

Sofern nicht anders angegeben, wurden Chemikalien vom Reinheitsgrad *per analysis* oder in der von den Herstellern gelieferten Qualität „für molekularbiologische Zwecke“ verwen-

det. Die Chemikalien sind in alphabetischer Reihenfolge in der Tabelle 2.2 aufgelistet.

Tab. 2.2: Verwendete Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
α [³² P]dATP, 370 MBq/ml, 37 TBq/mmol	Hartmann
α [³⁵ S]dATP, 370 MBq/ml, 37 TBq/mmol	Hartmann
Acrylamid/Bisacrylamid (38 %/2 %)	Roth
Adenin	Roth
Agar	BRL
Agarose	Biomol
Ampicillin	Sigma
APS	Roth
Biotin	Merck
Borsäure	Roth
Bromphenolblau	Merck
BSA	Merck
Calciumpantothenat	Merck
Chloramphenicol	Sigma
Chloroform	Roth
DAPI	Roth
DEPC	Sigma
DTT	Merck
EDTA	Roth
dNTPs	Eurogentec
Essigsäure	Roth
Ethidiumbromid	Biomol
Ethanol	Sonnenberg/Braunschweig
Ficoll 400	Merck
Formaldehyd	Roth
Formamid	Roth
Glukose	Caesar+Loretz, Hilden
Glycerin	Merck
Harnstoff	Roth
Hefe-Extrakt	BRL
Histidin	Roth
IPTG	PeqLab
Lambda-DNA (HindIII geschnitten)	BRL
Leucin	Roth
Lithiumacetat	Roth
Lithiumchlorid	Roth
Lysin	Merck
Natriumacetat	Roth
Natriumchlorid	Roth
Natriumcitrat	Roth
Natriumdihydrogenphosphat	Roth
Natriumhydrogenphosphat	Roth
Natriumhydroxyd	Roth
Nicotinsäure	Merck
Nucleobond Plasmid Midi Kit	Machery&Nagel
Nucleotrap Gel Extraction Kit	Machery&Nagel
Nylonmembran	Qiagen
PEG 4000	Roth

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Tab. 2.2: Verwendete Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Pepton 140	BRL
Phenol	Roth
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (50:48:2)	Roth
Polyvinylpyrrolidon	Merck
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
QIAquick Nucleotide Removal Kit	Qiagen
RNA-image Kit	GeneHunter Corp.
Natriumdodecylsulfat	Roth
Salzsäure (37 %)	Roth
Salmon Sperm-DNA, geschert	Roth
Sequenase 2.0	United States Biochemical (USB)
TEMED	Roth
Tris	Roth
Triton X-100	Roth
Uracil	Roth
X-Gal	PeqLab
Xylenblau	Merck

2.3 Medien

Für die Kultivierung von *S.pombe* wurden die folgenden Medien verwendet:

EMM	Edinburgh minimal medium
MEA	malt extract agar
MMA	minimal medium agar
MML	minimal medium liquid
YEA	yeast extract agar
YEL	yeast extract liquid
SSL	synthetic sporulation liquid
MMX	minimal medium with X-Gal

Die Zusammensetzung dieser Medien ist in [Egel \(1971\)](#), [Gutz *et al.* \(1974\)](#), [Moreno *et al.* \(1991\)](#) und [Alfa *et al.* \(1993\)](#) beschrieben. Das MMX Medium wurde nach den Angaben von [Guarente \(1991\)](#) angesetzt.

Zur Kultivierung von auxotrophen Stämmen wurde dem Medium nach Bedarf 150 mg/l Leucin, 50 mg/l Lysin, 75 mg/l Adenin, 100 mg/l Histidin oder 100 mg/l Uracil zugegeben.

E.coli Stämme wurden in LB (Luria-Bertani) Medium kultiviert ([Sambrook *et al.*, 1989](#)). Zur Selektion von Plasmiden wurde dem Medium Ampicillin (40 mg/l), Chloramphenicol (30 mg/l) oder Tetracyclin (15 mg/l) zugegeben. Als Wirt dienten die Stämme DH5 α , XL1-Blue und CJ236. Für die Identifizierung rekombinanter Klone mit Hilfe der α -Komplementierung (blau/weiß Selektion) wurde dem Medium 100 μ l IPTG (100 mM) und 50 μ l X-Gal Lösung (20 mg/ml in Dimethylformamid gelöst) zugegeben.

2.4 Stämme

2.4.1 Verwendete *S.pombe* Stämme

In der Tabelle [2.3](#) sind die *S.pombe* Stämme angegeben, die während dieser Arbeit hergestellt oder verwendet worden sind. Die Stämme wurde der Stammsammlung des Instituts für Genetik der TU Braunschweig entnommen und leiten sich den von Leupold ([Leupold, 1950](#)) beschriebenen Kulturen ab. Der Paarungstyp (PT) der Stämme ist jeweils angegeben

(h^{-S} , h^{+N}). Mutationen sind durch die entsprechende Allelbezeichnung gekennzeichnet. Die Integration von Vektoren in das *S.pombe* Genom ist durch ein vorangestelltes „int:“ angegeben.

Tab. 2.3: *S.pombe* Stämme

Bezeichnung	PT	Genotyp
AG8	h^{-S}	leu1-32 ura4-294
SL1	h^{-S}	leu1-32 ura4-D18 prp4-73 ^{ts}
SL11	h^{-S}	prp4-73 ^{ts} ura4-294
SL97	h^{-S}	leu1-32 ura4-D18 his7-366
HE639	h^{+N}	leu1-32 ura4-D18 ade6-M210
HE665	h^{-S}	leu1-32 ura4-D18 ade6-M216
L972	h^{-S}	

2.4.2 Verwendete *E.coli* Stämme

Die in der Tabelle 2.4 aufgelisteten Stämme wurden für Transformationen, die Vermehrung von Plasmid-DNA und als Wirt für den Bakteriophagen M13mp19 verwendet.

Tab. 2.4: *E.coli* Stämme

Stamm	Genotyp
DH5 α^{TM}	F ⁻ ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) Δ lacU196 deoR recA1 endA1 hsdR17 (rK ⁻ ,mK ⁺) supE44 λ^{-} thi-1 gyrA96 relA1
XL1-Blue	hsdR17 (rK ⁻ ,mK ⁺) endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 λ^{-} lac F'[proAB ⁺ lacI ^q lacZ Δ M15 Tn10(tet ^r)]
CJ236	dut1 ung1 thi-1 relA1 [pCJ105(Cam ^r)] F'[cat=(pCJ105;M13sCam ^r)]

Zur Replikation in *S.pombe* dient das *arsI* Element von *S.pombe*. In dem Vektor pRIP2 ist dieses Element deletiert (EcoRI Fragment), damit der Vektor durch eine homologe Rekombination in das *S.pombe* Genom integriert werden kann. Dafür kann der Vektor durch Schneiden mit dem Restriktionsenzym StuI linearisiert werden.

Für die Selektion in *S.pombe* enthält der Vektor pREP1 das *LEU2* Gen von *S.cerevisiae* und der Vektor pREP2 das *ura4⁺* Gen von *S.pombe*. Das *LEU2* Gen kann das *leu1-32* Allel von *S.pombe* komplementieren. Für die Vermehrung in *E.coli* besitzt der Vektor Teile des Plasmids pUC119.

Um die *srp2* cDNA mit dem *nmt1* Promotor durch Ligation in die BamHI Schnittstelle fusionieren zu können, mußte das Leseraster im Polylinker des Vektors angepaßt werden. Dazu wurde die SalI Schnittstelle mit Hilfe einer Klenow-Polymerase Reaktion aufgefüllt. Dabei wurden die Vektoren pREP1-S* und pREP2-S* erhalten.

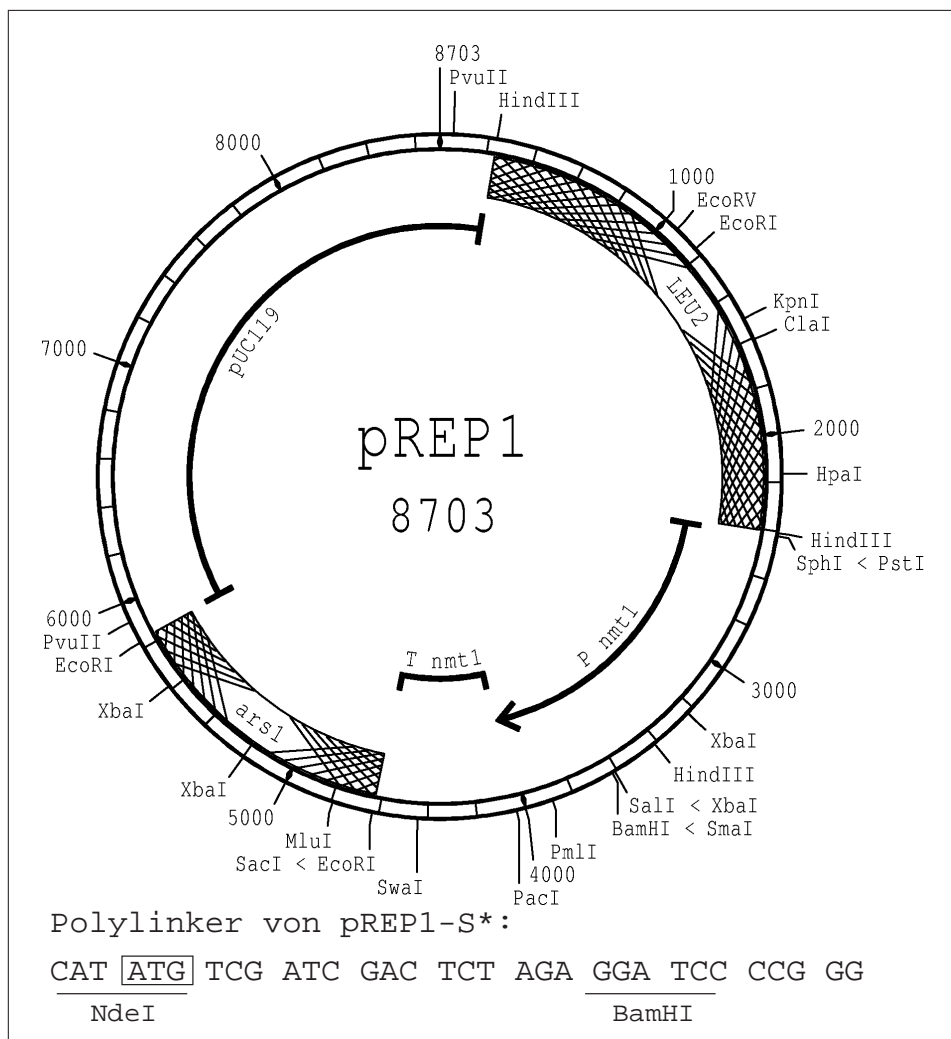


Abb. 2.2: Restriktionskarte des Vektors pREP1-S*. Es bedeuten: Pnmt1, *nmt1* Promotor; Tnmt1, *nmt1* Terminator; *ars1*, *arsI* Element von *S.pombe*; *LEU2*, *LEU2* Gen von *S.cerevisiae*. Das Start-codon, das nach der Transkription durch den *nmt1* Promotor für die Translation verwendet wird, ist durch einen Rahmen gekennzeichnet.

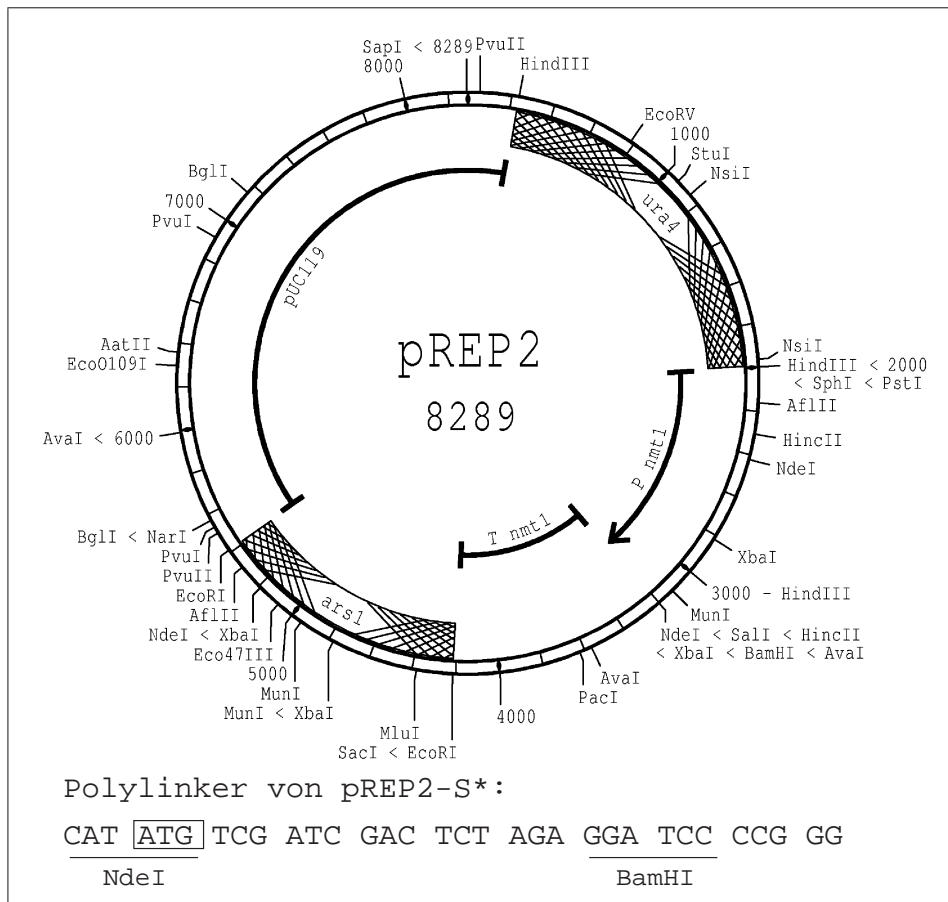


Abb. 2.3: Restriktionskarte des Vektors pREP2-S*. Es bedeuten: Pnmt1, *nmt1* Promotor; Tnmt1, *nmt1* Terminator; *ars1*, *ars1* Element von *S.pombe*; *ura4*, *ura4* Gen von *S.pombe*. Das Startcodon, das nach der Transkription durch den *nmt1* Promotor für die Translation verwendet wird, ist durch einen Rahmen gekennzeichnet.

2.5.3 pML1

Der Shuttlevektor pML1 wurde aus dem Vektor pREP2 und dem *srp2* Promotor hergestellt. Mit Hilfe einer PCR-Reaktion mit den Oligonukleotiden 5'-ATATCTGCAGTCGATGAA-ATTATCATCGCC-3' und 5'-ATATGGATCCCCATTTTTTGGGTAGTTGG-3' wurde ein 300 bp großer Abschnitt des *srp2* Gens amplifiziert. Dieser Abschnitt enthält den *srp2* Promotor.

Die beiden Primer haben an ihrem 5'-Ende jeweils die Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme PstI (5'-Primer) und BamHI (3'-Primer). Die Sequenz des 3'-Primers wurde so ausgewählt, daß das Startcodon (ATG) des *srp2* Gens erhalten bleibt. Die BamHI Schnittstelle folgt unmittelbar auf das Startcodon, so daß mit Hilfe dieser Schnittstelle DNA-Fragmente mit dem Promotor fusioniert werden können.

Nach der PCR-Reaktion wurde das PCR-Produkt aufgereinigt und mit den Restriktionsenzymen PstI und BamHI geschnitten. Anschließend wurde es in den Vektor pUC19 ligiert. Für die Herstellung des Vektors pML1 wurde der *nmt1* Promotor mit Hilfe der Restriktionsenzyme PstI und BamHI aus dem Vektor pREP2 entfernt und durch das 300 bp große PCR-Fragment ersetzt.

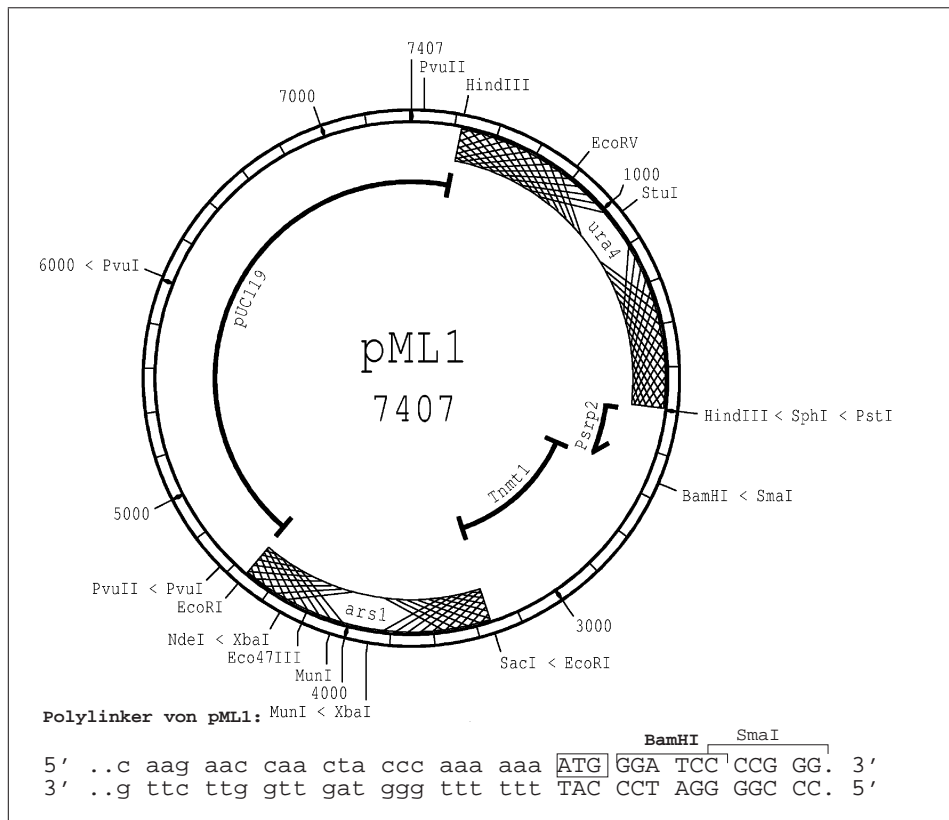


Abb. 2.4: Restriktionskarte des Vektors pML1. Der Vektor pML1 wurde aus dem Vektor pREP2 hergestellt. Anstelle des *nmt1* Promotors von *S.pombe* enthält der Vektor den *srp2* Promotor. Das Startcodon, das bei der Transkription durch den *srp2* Promotor verwendet wird, ist mit einem Rahmen gekennzeichnet. Unmittelbar auf das Startcodon folgt eine BamHI Schnittstelle, die für die Fusion von DNA-Fragmenten mit dem Promotor verwendet werden kann. Es bedeuten: Psp2, *srp2* Promotor; Tnmt1, *nmt1* Terminator; *ura4*, *ura4*⁺ Gen von *S.pombe*; *ars1*, *ars1* Element von *S.pombe*; pUC119, Teile des *E.coli* Vektors pUC119, enthält den ColE1 Origin sowie das β -Lactamase Gen (Ampicillinresistenz).

Zur Selektion in *S.pombe* enthält der Vektor das *ars1* Element und das *ura4*⁺ Gen von *S.pombe*. Eine Restriktionskarte des Vektors und des Polylinkers von pML1 ist in der Abb.2.4 gezeigt.

2.5.4 pTG Vektoren

Die Vektoren der pTG Serie sind eine Reihe von *S.pombe* Shuttlevektoren, die eine amino- oder carboxyterminale Fusion eines Proteins mit dem Green Fluorescent Protein (GFP) ermöglichen (Gross, 1997a). Für die Expression in *S.pombe* enthalten die Vektoren den *nmt1* Promotor von *S.pombe*, der durch die Zugabe von Thiamin in das Kulturmedium reprimiert werden kann. Das GFP ist mit dem *nmt1* Promotor fusioniert. Auf das offene Leseraster des GFP folgt ein Polylinker mit mehreren singulären Restriktionsschnittstellen. Auf den Polylinker folgt das Terminationselement des ribosomalen Proteingens L29/2 von *S.pombe*.

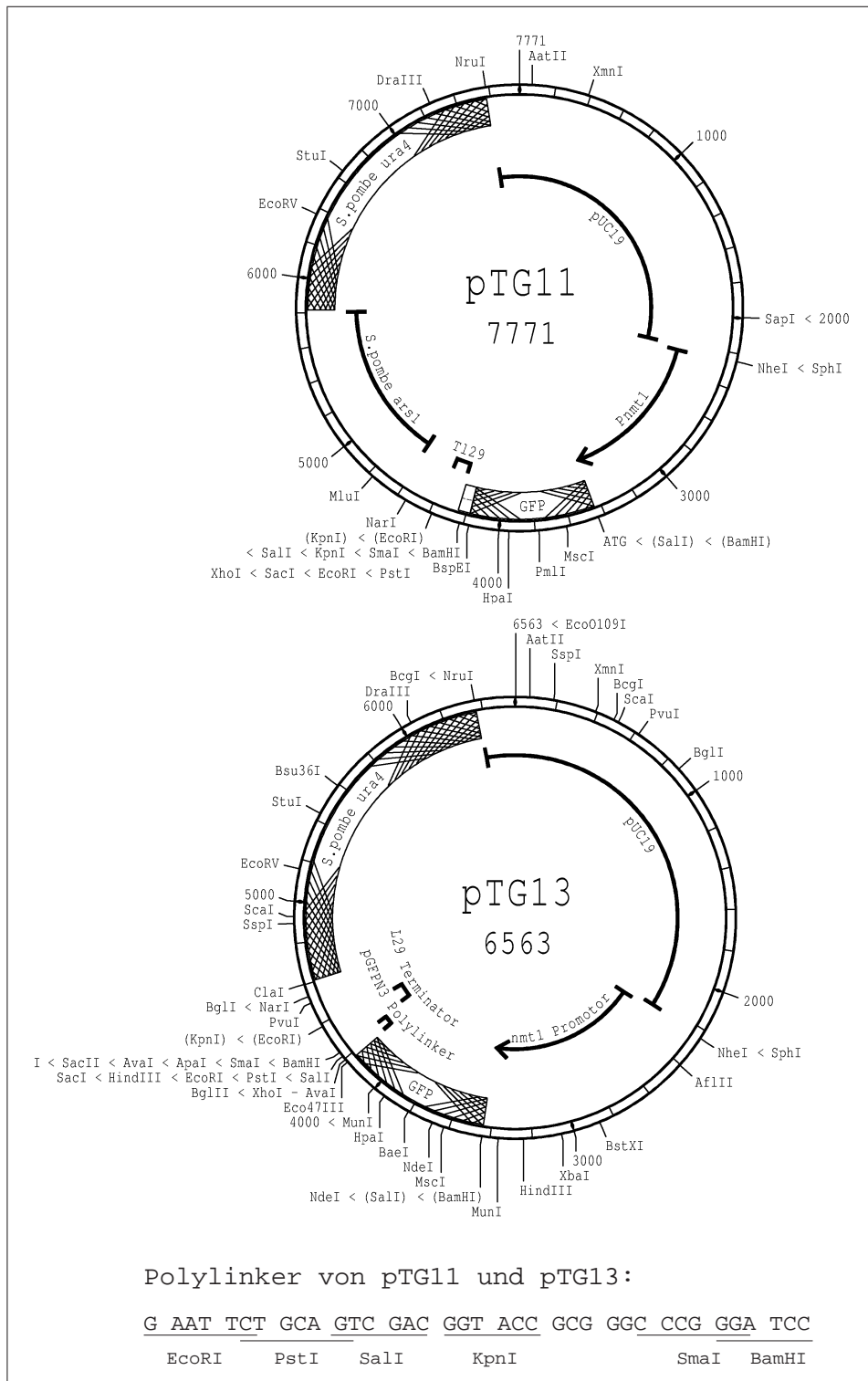


Abb. 2.5: Restriktionskarten der Vektoren pTG11 und pTG13. Es bedeuten: Pnmt1, *nmt1* Promotor; T129, Terminator des ribosomalen Proteingens L29/2; *ura4*, *ura4⁺* Gen von *S.pombe*; *ars1*, *ars1*, Element von *S.pombe*; GFP, Green Fluorescent Protein.

Für die Selektion in *S.pombe* enthält der Vektor pTG11 das *arsI* Element sowie das *ura4⁺* Gen von *S.pombe*. Für die Selektion in *E.coli* enthält der Vektor Sequenzen aus dem Vektor pUC19. Der Vektor pTG13 ist ein Integrationsvektor und kann in das *ura4* Gen integriert werden. Für die Integration in den *ura4* Locus kann der Vektor mit Hilfe der Restriktionschnittstelle *StuI*, die sich im *ura4* Gen befindet, linearisiert werden.

2.5.5 pJK148

Für Integration in den *leu1* Locus von *S.pombe* wurde der Shuttlevektor pJK148 verwendet. Der Vektor enthält das *leu1⁺* Gen von *S.pombe*. Für die Selektion in *E.coli* enthält der Vektor ein Ampicillin-Resistenzgen, einen Replikationsursprung (ColE1 Ori) und das *lacZ'* Gen von *E.coli*, das in Verbindung mit einem geeigneten *E.coli* Stamm die Blau/Weiß Selektion (α -Komplementierung) ermöglicht. Für die Integration in den *leu1* Locus von *S.pombe* kann der Vektor mit Hilfe der Restriktionsschnittstellen *NruI*, *Eco47III*, *NdeI* und *SunI*, die im *leu1* Gen liegen, linearisiert werden.

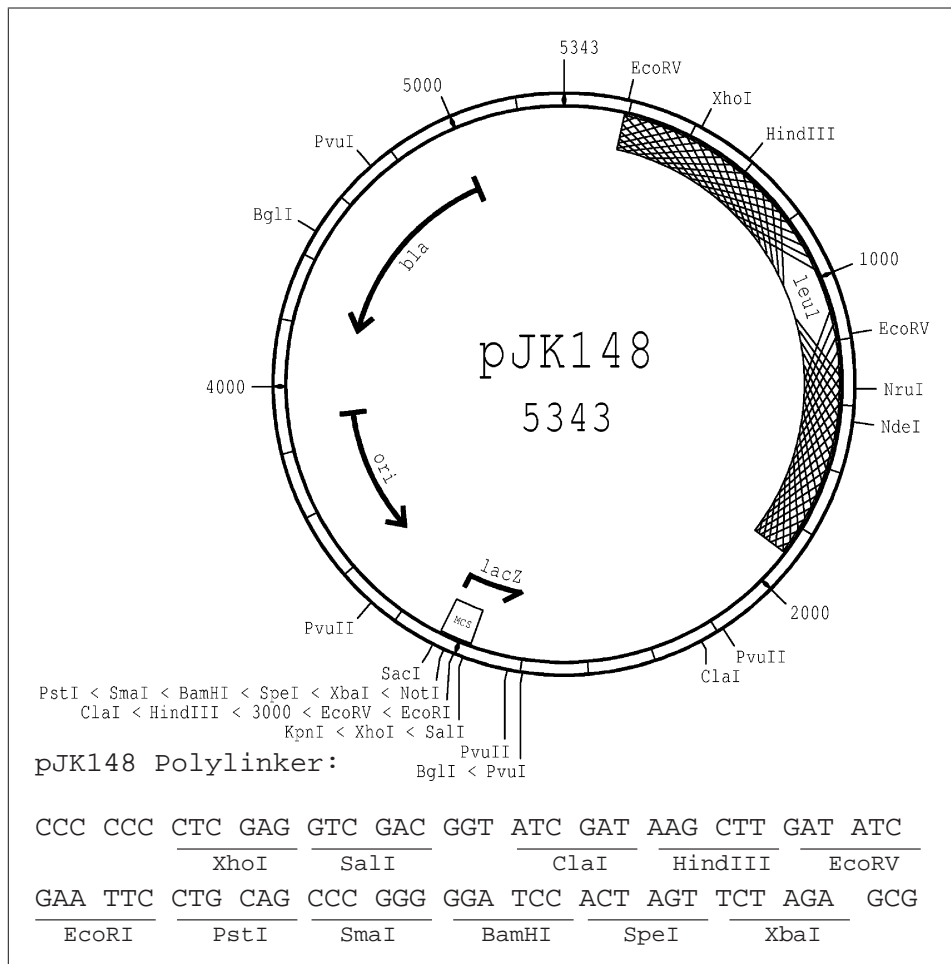


Abb. 2.6: Restriktionskarte von pJK148. Es bedeuten: *leu1*, *leu1⁺* Gen aus *S.pombe*; *lacZ*, *lacZ* Gen von *E.coli*; *bla*, β -Lactamase Gen (Ampicillinresistenz); *ori*, Replikationsursprung (ColE1) von *E.coli*.

2.6 Verwendete *S.pombe* Banken

Die *srp2* cDNA wurde aus einer *S.pombe* cDNA Bank der Firma Clontech isoliert. Die cDNA-Bank wurde aus mRNA von exponentiell wachsenden *S.pombe* Zellen hergestellt. Nach den Angaben des Herstellers beträgt die Anzahl unabhängiger Ausgangs-Klone 1×10^7 . Die Größe der cDNA Inserts ist mit 0,4 – 2,5 kb angegeben und beträgt im Durchschnitt 1,3 kb. Die cDNAs wurden mit Hilfe der Restriktionsenzyme EcoRI (5'-Ende) und XhoI (3'-Ende) gerichtet in den Vektor pGAD GH ligiert. Eine Restriktionskarte des Vektors pGAD GH ist in der Abb.2.7 gezeigt.

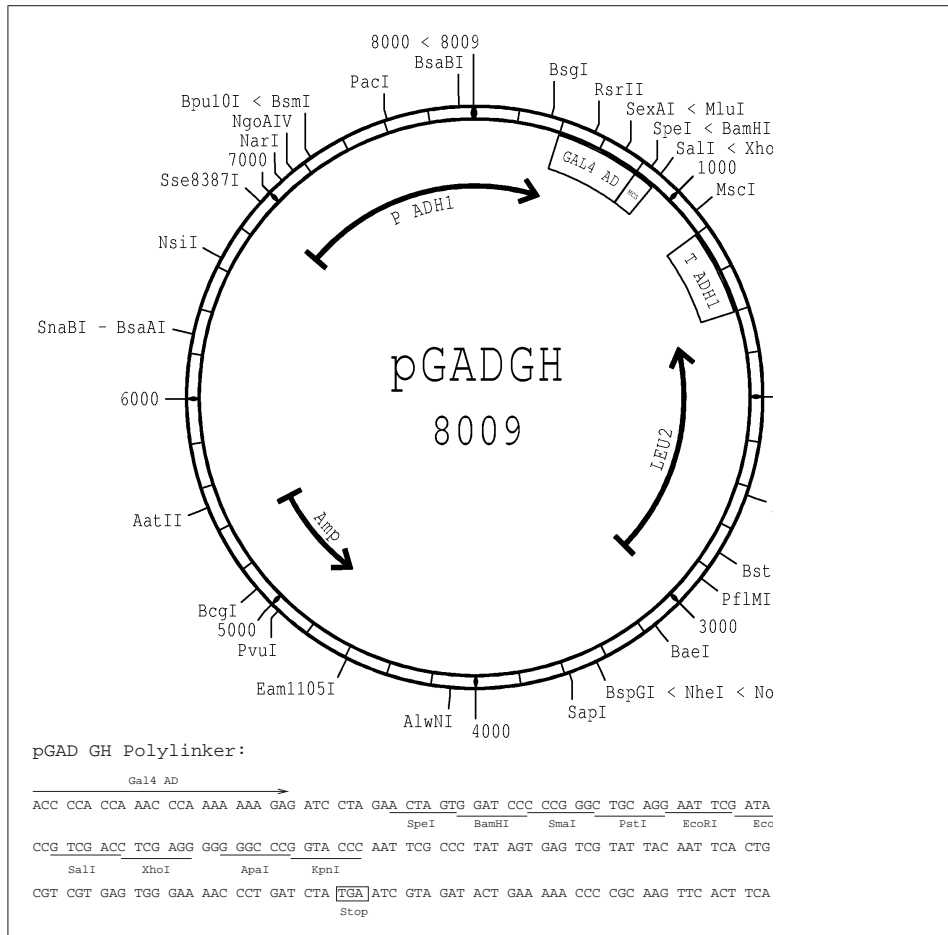


Abb. 2.7: Restriktionskarte des Vektors pGAD GH. Der Vektor pGAD GH ist für das Two-Hybrid System konzipiert und enthält die Sequenz der transkriptionsaktivierenden Domäne des *GAL4* Gens von *S.cerevisiae*. Der Vektor enthält einen Polylinker am Ende des offenen Leserasters der *GAL4_{AD}*. Für die Expression von *GAL4*-Fusionsproteinen in *S.cerevisiae* enthält der Vektor den *ADH1*-Promotor (*PADH1*) und Terminator (*TADH1*) von *S.cerevisiae*. Für die Selektion in *S.cerevisiae* hat der Vektor den 2μ Origin und das *LEU2* Gen aus *S.cerevisiae*. Für die Selektion in *E.coli* enthält der Vektor das β -Lactamase Gen (Ampicillinresistenz) und den *ColE1* Replikationsursprung von *E.coli*.

Das *srp2* Gen wurde aus einer genomischen *S.pombe* Bank (Barbet *et al.*, 1992) isoliert. Die Bank wurde aus chromosomaler *S.pombe* DNA hergestellt, die partiell mit dem Restriktionsenzym Sau3A geschnitten worden ist. Die Enden der Fragmente wurden mit Hilfe einer Klenow-Polymerase-Reaktion partiell aufgefüllt. Die Fragmente wurden in die partiell aufgefüllte SalI Schnittstelle des Vektors pUR19 ligiert. Die Bank enthält ca. 30.000 unabhängige Klone. Die durchschnittliche Länge der Inserts beträgt 3,5 kb. Eine Restriktionskarte des Vektors pUR19 ist in der Abb.2.8 gezeigt.

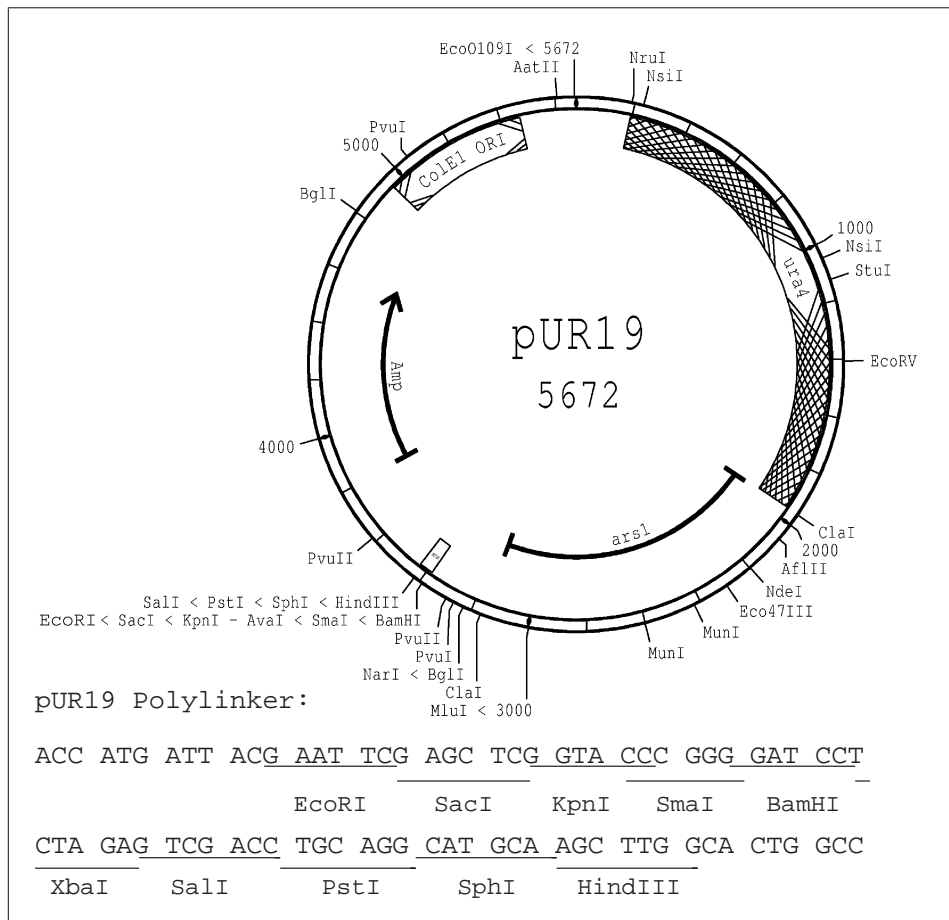


Abb. 2.8: Restriktionskarte des Vektors pUR19. Der Vektor enthält das *ura4⁺* Gen und das *arsI* Element von *S.pombe*. Für die Selektion in *E.coli* enthält der Vektor das β -Lactamase Gen (Ampicillinresistenz), den ColE1 Replikationsursprung und das *lacZ'* Gen von *E.coli*, das in Verbindung mit einem geeigneten *E.coli* Stamm die Blau/Weiß Selektion (α -Komplementierung) ermöglicht.

2.7 Methoden zur Untersuchung von *S.pombe*

2.7.1 Transformation von *S.pombe*

S.pombe Transformationen wurden nach einem modifizierten Verfahren von Okazaki (Okazaki *et al.*, 1990) durchgeführt. Für die Transformation wurden 100 ml EMM mit einer wachsenden *S.pombe* Vorkultur angeimpft. Die Kultur wurde solange inkubiert, bis eine optische Dichte von $OD_{600} = 0,6$ bis 1,0 erreicht war. Die *S.pombe* Zellen wurden dann für 5 min mit 3.000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 50 ml ddH₂O gewaschen. Anschließend wurde für 5 min mit 3.000 Upm zentrifugiert und das Pellet in 1 ml 0,3 M Lithiumacetat aufgenommen. Darin wurden die Zellen für 1 h inkubiert. Der Ansatz wurde alle 10 min leicht geschüttelt, damit die Zellen nicht zu Boden sinken.

Für die Transformation wurden jeweils 100 μ l Zellen in ein 2 ml Reaktionsgefäß gegeben und mit 10 μ l Kalbsthymus-DNA (10 mg/ml) gemischt. Für die Transformation von Plasmiden mit *arsI* Element wurden 0,5–2,0 μ g Plasmid-DNA eingesetzt. Für die Integration von Plasmiden in das *S.pombe* Genom wurden bis zu 10 μ g der linearisierten Plasmid-DNA verwendet.

Der Ansatz wurde nun für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und ab- und zu geschüttelt. Anschließend wurde 1 ml 40 % PEG-4000 Lösung (w/v) hinzugegeben und für weitere 45 min inkubiert. Danach wurde eine Hitzeschock-Behandlung durchgeführt, indem die Ansätze für 15 min in ein Wasserbad mit einer Temperatur von 42 ° C gestellt wurden.

Durch Zentrifugieren für 5 min mit 4.000 Upm wurden die *S.pombe* Zellen pelletiert und der Überstand verworfen. Um das überschüssige PEG-4000 zu entfernen, wurden die Zellen 2 × mit 1 ml ddH₂O gewaschen. Nach der Transformation wurden die Zellen auf Minimalmedium ausplattiert und für mehrere Tage bei 25 ° C oder 30 ° C inkubiert.

2.7.2 Isolierung von DNA aus *S.pombe*

Für die Isolierung von chromosomaler DNA wurden aus einer Übernachtskultur Kultur 10–20 ml entnommen und für 5 min mit 3.000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit ddH₂O gewaschen. Das Pellet wurde in 400 µl Puffer (2 % (v/v) Triton X-100, 1 % SDS (w/v), 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA) aufgenommen und in ein 2 ml Reaktionsgefäß mit 0,3 g Glasperlen (Durchmesser 0,5 mm) und 400 µl PCIA gegeben. Das Gefäß wurde mit ParafilmTM fest verschlossen. Die Zellen wurden dann mit Hilfe der FastPrep Maschine für 30 sec mit 4,0 m sec⁻¹ aufgeschlossen. Dann wurden 400 µl TE Puffer hinzugegeben und gemischt.

Die Zelltrümmer wurden für 15 min mit 13.000 Upm abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und mit PCIA extrahiert. Dieser Schritt wurde solange wiederholt, bis keine Interphase mehr zu erkennen war. Dann wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß gegeben. Durch die Zugabe von 2,5 Volumen Ethanol (96 %) und 1/10 Volumen Natriumacetat wurde die chromosomale DNA gefällt.

Die DNA wurde nun in 400 µl TE aufgenommen und für 30 min mit 5 µl RNase A (10 mg/ml) behandelt. Die RNase A wurde durch eine PCIA Extraktion aus dem Ansatz entfernt und die DNA durch eine Ethanolpräzipitation gefällt. Mit diesem Verfahren wurden aus 30 ml Zellkultur etwa 50 µg chromosomale *S.pombe* DNA isoliert.

2.7.3 Isolierung von RNA aus *S.pombe*

Für die Isolierung von Gesamt-RNA wurden aus einer wachsenden *S.pombe* Kultur 10–50 ml entnommen und für 5 min mit 3.000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen mit 10–50 ml ddH₂O gewaschen. Das Pellet wurde dann bei -80 ° C eingefroren.

Um die RNA aus den Zellen zu extrahieren, wurden zu dem auf Eis aufgetauten Pellet 400 µl LETS-Puffer mit 1 % LiDS gegeben (100 mM LiCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 10 mM EDTA, Lithiumsalz in 1 % LiDS). Der Ansatz wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß (I) mit 0,3 g Glasperlen (Durchmesser 0,5 mm) gegeben und fest verschlossen. Die Proben wurden dann für 30 sec mit 4,5 m sec⁻¹ mit Hilfe der FastPräp Maschine aufgeschlossen und sofort auf Eis gestellt. Anschließend wurde der Ansatz mit 400 µl LETS-Puffer (0,2 % LiDS) gemischt.

Die Proben wurden dann mit 800 µl PCIA vermischt und geschüttelt. Anschließend wurde für 10 min in der Kühlzentrifuge mit 13.000 Upm bei 4 ° C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß (II) gegeben und erneut mit 800 µl PCIA extrahiert. Die aufgeschlossenen Zellen (I) wurden mit 800 µl LETS-Puffer mit 0,2 % LiDS re-extrahiert. Nun wurde in der Kühlzentrifuge für 10 min bei 4 ° C zentrifugiert.

Der Überstand aus dem Reaktionsgefäß (II) wurde in ein neues Reaktionsgefäß (III) gegeben und mit 800 µl PCIA extrahiert. Der Überstand aus dem Reaktionsgefäß (I) wurde zur Phenol-Phase vom Reaktionsgefäß (II) gegeben. Die Extraktion der Proben wurde solange fortgesetzt, bis keine Interphase mehr zu erkennen war. Dann wurden die Überstände vereint und die RNA durch Zugabe von 5 ml Ethanol (96 %) und 40 µl 5 M LiCl auf Eis gefällt. Anschließend wurde für 20 min mit 13.000 × g in der Kühlzentrifuge zentrifugiert.

Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 400 μ l ddH₂O aufgenommen. Durch die Zugabe von 2 ml Ethanol (96 %) und 16 μ l LiCl wurde die RNA erneut gefällt. Nach dem Zentrifugieren wurde das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen und getrocknet.

Die getrocknete RNA wurde in 50–100 μ l ddH₂O aufgenommen. Die Konzentration der RNA wurde anschließend photometrisch bestimmt und auf 3 μ g/ μ l eingestellt.

Präparation von mRNA aus *S.pombe*

Für die Präparation von poly(A)⁺ mRNA aus *S.pombe* Gesamt-RNA wurde das OligoTex Kit der Firma Qiagen verwendet. Das OligoTex Kit ist für die Präparation von bis zu 10 μ g mRNA aus 1 mg Gesamt-RNA geeignet. Die Aufarbeitung der mRNA erfolgte nach der Vorschrift des Herstellers.

2.7.4 Kreuzungen

Um haploide Stämme zu kreuzen wurden diese auf YEA Medium ausgestrichen und für 2–3 Tage bei 30 °C inkubiert. Die Zellen wurden dann in 1–2 ml 0,85 % Natriumchlorid Lösung suspendiert und vermischt. Die Mischung wurde auf MEA Platten getropft und für drei Tage bei 25 °C inkubiert. Die Isolierung der Ascosporen für die Tetradenanalyse erfolgte mit einem Singer MSM Mikromanipulator. Für die Untersuchung von freien Ascosporen, wurde der Kreuzungsansatz für 30 min mit 30 % Ethanol behandelt, damit die vegetativen Zellen abgetötet werden. Die Sporen wurden dann auf YEA Medium ausplattiert.

2.7.5 Herstellung diploider Stämme

Für die Herstellung von diploiden *S.pombe* Stämmen wurden stets haploide Stämme mit den auxotrophen Marken *ade6-M210* und *ade6-M216* miteinander gekreuzt. Das *ade6* Gen kodiert für ein Enzym im Adeninstoffwechsel. In haploiden Zellen häuft sich bei einer Mutation im *ade6* Gen ein Zwischenprodukt des Adeninstoffwechsels an, das die Zellen rot färbt.

Haploide Zellen, die das *ade6-M210* Allel haben bilden deshalb dunkelrot gefärbte Kolonien. In haploiden Zellen, die das *ade6-M216* Allel besitzen, wird das Zwischenprodukt nicht so stark in den Zellen angehäuft, so daß diese Zellen rosa gefärbte Kolonien bilden. Diploide Zellen, die heterozygot für beide Allele sind, bilden weiße Kolonien, weil zwischen den beiden Allelen eine intragene Komplementation stattfindet. Auf diese Weise können haploide von diploiden Zellen anhand der Koloniefärbung unterschieden werden.

Für die Herstellung von diploiden Zellen wurden deshalb zwei haploide Stämme mit jeweils einem der beiden *ade6* Allele auf SPA Medium gekreuzt. Nachdem die Zellen 15 Stunden lang bei 25 °C inkubiert wurden, wurde das Zellmaterial auf MMA Medium ausgestrichen. Wenn bei der Kreuzung diploide Stämme mit homozygoten auxotrophen Marken hergestellt werden sollten, dann wurden dem Medium entsprechende Supplemente hinzugefügt.

Ein Teil der diploiden Zygoten wuchs nach ca. drei Tagen bei 30 °C auf dem Minimalmedium zu Kolonien heran. Diese wurden auf D-MMA Medium (pro Liter: 1,7 g Yeast Nitrogen Base, 5,0 g (NH₄)₂SO₄, 10,0 g Glukose, 25 g Agar) ausgestrichen und für zwei Tage bei 30 °C inkubiert. Die auf diese Weise gewonnenen diploiden Zellen wurden für das Gen-Disruption von *srp2* verwendet. Dazu wurden die haploiden Stämme mit dem Genotyp h⁺N leu1-32 ura4-D18 *ade6-M210* (HE665) und h^{-S} leu1-32 ura4-D18 *ade6-M216* (HE639) miteinander gekreuzt.

2.7.6 FACS Analyse von *S.pombe* Kulturen

Die FACS-Analyse (Fluorescence Activated Cell Sorter) von *S.pombe* Kulturen wurde mit einem FACS-Calibur Gerät der Firma Becton-Dickinson durchgeführt. Für die Messung

wurde die Zellzahl der Proben durch Auszählen mit Hilfe einer Zählkammer bestimmt und auf $1 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$ eingestellt. Die Proben wurden anschließend für 5 min mit 2.500 Upm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde dann in 2 ml eiskaltem H_2O aufgenommen und nochmals für 5 min mit 2.500 Upm zentrifugiert. Die Zellen wurden anschließend in 300 μl eiskaltem H_2O aufgenommen und dann mit 700 μl 70 % Ethanol vermischt. Nach dieser Fixierung wurden die Zellen bei -80°C eingefroren.

Für die Färbung der Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid wurden die aufgetauten Zellen mit 1 ml 50 mM Natriumcitrat Lösung (pH 7–8) gewaschen. Nach dem Zentrifugieren für 5 min mit 2.500 Upm wurden die Zellen in 500 μl 50 mM Natriumcitrat Lösung (pH 7–8, mit 1 mg/ml RNase A) aufgenommen und in ein lichtundurchlässiges 1 ml Reaktionsgefäß gegeben. Zum Abbau der RNA wurden die Zellen für 3 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 450 μl 50 mM Natriumcitrat Lösung und 50 μl 50 mM Natriumcitratlösung mit 200 $\mu\text{g/ml}$ Propidiumiodid zu den Proben gegeben. Die Färbung der Zellen erfolgte über Nacht bei 4°C . Die FACS Messungen wurden am Tag nach der Färbung durchgeführt.

2.7.7 Indirekte Fluoreszenzmikroskopie und DAPI-Färbung

Para-Formaldehyd/Sorbitol-Fixierung

Für die Darstellung von GFP mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie wurden die *S.pombe* Zellen in einer Mischung aus Para-Formaldehyd und Sorbitol fixiert: Dazu wurden 10 ml einer wachsenden *S.pombe* Kultur ($\geq 3 \times 10^6$ Zellen/ml) mit 10 ml 2,4 M Sorbitol (in EMM Medium gelöst) vermischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 1,4 ml Para-Formaldehyd Lösung¹ hinzugegeben und der Ansatz für 30 min geschüttelt.

Die Zellen wurden anschließend für 5 min mit 3.000 Upm abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml PEM (100 mM Pipes, 1 mM EGTA, 1 mM MgSO_4 , pH 6,9) aufgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Danach wurden die Zellen für 4 min mit 13.000 Upm abzentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet erneut in 1 ml PEM gewaschen.

Nach diesem Schritt wurde das Pellet in 1 ml PEMSZ (1 M Sorbitol in PEM gelöst, mit 0,5 mg/ml Zymolyase 100 T) aufgenommen und für 70 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 4 min mit 13.000 Upm zentrifugiert.

Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in 1 ml PEMST (1 M Sorbitol in PEM gelöst mit 1 μl Triton-X 100/ml) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen 2- bis 3mal in PEM gewaschen, in 100 μl PEMBAL (1 % BSA – globulin- und fettsäurefrei, 0,1 % NaN_3 , 0,1 M L-Lysin in PEM gelöst) aufgenommen und für 30–60 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Para-Formaldehyd/Glutaraldehyd-Fixierung

Für die Darstellung von GFP und der Mikrotubuli von *S.pombe* Zellen mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie wurden die Zellen in einer Mischung aus Para-Formaldehyd und Glutaraldehyd fixiert: 10 ml einer wachsenden *S.pombe* Kultur ($\geq 3 \times 10^6$ Zellen/ml) wurden mit 1,4 ml Para-Formaldehyd Lösung¹ vermischt. Danach wurden 40 μl Glutaraldehyd (50 %) hinzugegeben und dieser Ansatz für 30 min geschüttelt. Die Zellen wurden anschließend für 5 min mit 3.000 Upm abzentrifugiert.

Nun wurde das Pellet in 1 ml PEM aufgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Die Zellen wurden für 4 min mit 13.000 Upm abzentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet erneut in 1 ml PEM gewaschen.

¹Für die Herstellung der Para-Formaldehyd Lösung wurden 3 g Para-Formaldehyd in 10 ml PEM (100 mM Pipes, 1 mM EGTA, 1 mM MgSO_4 , pH 6,9) gelöst und auf 65°C erwärmt. Anschließend wurden 20 Tropfen 5 N NaOH hinzugeben und solange bei 65°C inkubiert, bis die Lösung vollkommen klar geworden ist.

Nach diesem Schritt wurde das Pellet in 1 ml PEMSZ (1 M Sorbitol in PEM gelöst, mit 0,5 mg/ml Zymolyase 100 T) aufgenommen und für 70 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurden die Zellen für 4 min mit 13.000 Upm zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet in 1 ml PEMST (1 M Sorbitol in PEM gelöst mit 1 μ l Triton-X 100/ml) gewaschen.

Die Zellen wurden nun in 700 μ l einer Lösung aus 5 ml PEM und einer Spatelspitze Natriumborhydrid suspendiert und darin für kurze Zeit inkubiert.

Danach wurde für 4 min mit 13.000 Upm zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet zuerst mit 1 ml und dann mit 100 μ l PEM gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 100 μ l PEMBAL (1 % BSA – globulin- und fettsäurefrei, 0,1 % NaN_3 , 0,1 M L-Lysin in PEM gelöst) aufgenommen und für 30–60 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Antikörper-Reaktion

Für die Darstellung des GFP wurden die *S.pombe* Zellen über Nacht in 100 μ l einer 1:1000 Verdünnung (in PEMBAL) eines polyklonalen GFP-Antikörpers (aus dem Kaninchen, Clontech) inkubiert.

Für die Darstellung der Mikrotubuli wurde eine 1:80 Verdünnung (in PEMBAL) des TAT-1 Antikörpers (aus der Maus) verwendet (Woods *et al.*, 1989).

Am nächsten Tag wurden die *S.pombe* Zellen 3mal mit PEMBAL gewaschen und dann mit 100 μ l einer 1:100 Verdünnung des sekundären Antikörpers über Nacht inkubiert. Als sekundärer Antikörper wurde ein FITC markierter Anti-Kaninchen Antikörper aus der Ziege (Sigma) und ein FITC markierter Anti-Maus Antikörper aus dem Schaf (Sigma) verwendet.

Nach der Antikörper-Reaktion wurden die Zellen einmal mit 100 μ l PEMBAL und einmal mit PBS (pro Liter: 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na_2HPO_4 , 0,24 g KH_2PO_4 , pH 7,4) gewaschen. Dann wurden die Zellen in 40 μ l PBS mit 0,1 % NaN_3 aufgenommen und lichtgeschützt bei 4 ° C aufbewahrt.

DAPI-Färbung

Zur Darstellung des Zellkerns wurden die *S.pombe* Zellen in 100 μ l einer Lösung aus 0,2 μ g DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol) in PBS gefärbt. Dazu wurden die Zellen in der Lösung suspendiert und sofort wieder abzentrifugiert. Anschließend wurden die *S.pombe* Zellen in 40 μ l PBS mit 0,1 % NaN_3 aufgenommen und lichtgeschützt bei 4 ° C aufbewahrt.

2.7.8 Direkte Fluoreszenz-Mikroskopie

Für die Darstellung von GFP-Fusionsproteinen *in vivo* wurden die *S.pombe* Zellen in Minimalmedium ohne Thiamin für 12 bis 16 h kultiviert. Von der Kultur wurden 50 – 100 μ l auf ein mit Concanavalin A Lösung (1 mg/ml) beschichtetes Deckglas gegeben. Nach dem Absinken der Zellen wurde die überschüssige Flüssigkeit entfernt. Das Deckglas wurde anschließend auf einen Objekträger gelegt, auf den zuvor ein Tropfen 1 % (w/v) LM-Agarose (in EMM gelöst) gegeben wurde.

Nach dem Erstarren der Agarose wurden die Präparate mit einem Zeiss Axioplan 2 Fluoreszenz Mikroskop betrachtet. Für die Darstellung des GFP wurde der Filtersatz 09/487909-0000 verwendet. Die Zellen wurden mit einer Zeiss Axiophot 2 Kamera fotografiert. Für die Aufnahmen wurde Kodak Elite II 400 Film verwendet.

2.7.9 Messung der β -Galaktosidase Aktivität in *S.pombe*

Zur Kontrolle der stabilen Integration von Plasmiden, die das *lacZ* Gen von *E.coli* enthalten, wurden die *S.pombe* Zellen nach mehrmaliger Deselektion in YEL Medium auf

MMX Medium gestempelt. Die Integration wurde als „stabil“ angesehen, wenn alle Kolonien blau gefärbt waren. Die Integration der Plasmide wurde anschließend durch eine Southern-Hybridisierung überprüft.

Für die Messung der β -Galaktosidase Aktivität wurde ein Gesamt-Proteinextrakt aus den *S.pombe* Zellen hergestellt. Dazu wurden 50 ml einer Kultur verwendet, die bis zu einer OD_{600} von 0,8 gewachsen ist. Die *S.pombe* Zellen wurden für 5 min mit 3.000 Upm abzentrifugiert und mit ddH₂O gewaschen.

Das Pellet wurde in 800 μ l eiskaltem Z-Puffer (60 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 50 mM Mercaptoethanol, pH 7,0) aufgenommen und in ein 2 ml Reaktionsgefäß gegeben. Nach der Zugabe von 0,3 g Glasperlen wurden die Zellen mit 4,5 m sec⁻¹ für 3 \times 30 sec mit Hilfe der FastPräp Maschine aufgeschlossen. Zwischendurch wurde der Ansatz auf Eis gekühlt. Anschließend wurden die Zelltrümmer für 15 min mit 13.000 Upm abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß gegeben.

Für die Messung der β -Galaktosidase Aktivität wurden jeweils 10 μ l des Proteinextrakts in eine Mischung aus 200 μ l ONPG Lösung (4 mg/ml) und 800 μ l Z-Puffer gegeben. Der Umsatz von ONPG wurde durch die Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 420 nm über einen Zeitraum von 15 min bestimmt.

Die Umrechnung des Umsatz von ONPG in „Miller-Units“ erfolgte nach der Gleichung $Units = (1000 \times OD_{420}) \times (min \times ml \times OD_{600})^{-1}$ (Guarente, 1991). Alle Meßwerte wurden durch eine Dreifachbestimmung ermittelt und die Standardabweichung berechnet.

2.8 Standard DNA-Methoden

2.8.1 Transformation von *E.coli*

Die Transformation von *E.coli* Zellen erfolgte mit Hilfe der Methode von (Brown *et al.*, 1975). Für die Herstellung der kompetenten Zellen wurden 100 ml Medium mit 1 ml einer stationären *E.coli* Vorkultur angeimpft. Die 100 ml Kultur wurde solange bei 37 °C geschüttelt, bis eine OD_{600} von 0,4 erreicht wurde. Die Kultur wurde dann auf zwei 50 ml Polypropylen-Röhrchen aufgeteilt und die *E.coli* Zellen wurden für 10 min mit 3.000 Upm bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und zu den Pellets wurden jeweils 20 ml eiskalte 100 mM CaCl₂ Lösung gegeben. Darin wurden die *E.coli* Zellen vorsichtig resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde für 10 min mit 3.000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die kompetenten *E.coli* Zellen in 10 ml 100 mM CaCl₂ Lösung mit 15 % (v/v) Glycerin aufgenommen, in Aliquots zu jeweils 450 μ l aufgeteilt und bei -80 °C eingefroren.

Für die Transformation wurden die kompetenten *E.coli* Zellen auf Eis aufgetaut. Jeweils 200 μ l der kompetenten *E.coli* Zellen wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit der wäßrigen DNA-Lösung vermischt und für 40 min auf Eis inkubiert. Anschließend folgte eine Hitzeschock-Behandlung. Dazu wurde der Ansatz für 2 min in einem Wasserbad mit einer Temperatur von 42 °C inkubiert und danach sofort wieder ins Eis gestellt. Dann wurde 1 ml LB Medium hinzugegeben und der Ansatz für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nun wurden die *E.coli* Zellen für 5 min mit 5.000 Upm abzentrifugiert, in 100 μ l LB Medium aufgenommen und auf LB Agar mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.8.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Plasmid Mini-Präparation

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli* wurde die folgende Methode verwendet (Gattermann *et al.*, 1988): Eine 2 ml *E.coli* Übernachtskultur wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß gegeben und für 2 min mit 13.000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen

und das Bakterienpellet im restlichen Kulturmedium resuspendiert. Danach wurden 110 μ l STET Puffer hinzugegeben (8 % Saccharose (w/v), 5 % Triton X-100 (v/v), 50 mM Tris-HCL (pH 8,0), 50 mM EDTA, 0,5 mg/ml Lysozym) und vorsichtig mit den *E.coli* Zellen gemischt. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Ansatz für 2 min in einem kochenden Wasserbad erwärmt. Anschließend wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation für 15 min mit 13.000 Upm abgetrennt. Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß gegeben. Durch die Zugabe von 110 μ l Isopropanol wurde die Plasmid-DNA gefällt. Anschließend wurde für 15 min mit 13.000 Upm zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und unter Vakuum getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde anschließend in 50 μ l ddH₂O gelöst.

Plasmid Midi-Präparation

Für die Isolierung von bis zu 100 μ g Plasmid-DNA aus einer *E.coli* Kultur wurde das Nucleobond AX100 Kit der Firma Machery & Nagel verwendet. Die Plasmid-DNA wurde nach der Vorschrift des Herstellers isoliert.

2.8.3 PCIA-Extraktion und Fällung von DNA

Um DNA von Proteinen zu reinigen wurde eine PCIA Extraktion durchgeführt. Dazu wurde der wässrigen DNA Lösung 1 Volumen PCIA (Phenol, Chloroform, Isoamylalkohol im Verhältnis 50:48:2) zugegeben und die beiden Phasen durch starkes Schütteln vermischt. Nach dem Zentrifugieren für 15 min mit 13.000 Upm wurde die obere wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß gegeben. Die Extraktion wurde solange wiederholt, bis keine Interphase mehr zu erkennen war. Die DNA wurde dann durch die Zugabe von 2,5 Volumen Ethanol (96 %) und 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat gefällt. Die Fällung erfolgte bei -20 °C für 1 h. Die DNA wurde anschließend durch Zentrifugieren mit 13.000 Upm für 15 min bei 4 °C pelletiert, getrocknet und schließlich in ddH₂O aufgenommen.

2.8.4 Konzentrationsbestimmung von DNA/RNA

Die Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren in wässriger Lösung erfolgte photometrisch mit einem Beckmann DU-530 Spektralphotometer. Es wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Eine Extinktion von $E_{260}=1,0$ entspricht bei einer Schichtdicke von 1 cm einer Konzentration von etwa 40 μ g/ml ssDNA oder ssRNA bzw. 50 μ g/ml dsDNA.

2.8.5 Spaltung von DNA mit Hilfe von Restriktionsenzymen

Für die Spaltung doppelsträngiger DNA wurden Restriktionsendonucleasen der Firmen Gibco-BRL, MBI Fermentas und New England Biolabs (NEB) verwendet. Plasmid-DNA wurde mit mindestens 1 U Restriktionsenzym pro μ g DNA für 1 h geschnitten. Chromosomale *S.pombe* DNA wurde pro μ g mit 5 U Restriktionsendonuclease über Nacht inkubiert. Zur Entfernung von RNA wurde den Restriktionsansätzen jeweils 0,1 μ l RNase A (10 mg/ml) pro 10 μ l Ansatz zugegeben. Die Reaktionspuffer und Reaktionstemperaturen wurden nach Angaben des Herstellers ausgewählt.

2.8.6 Klenow-Polymerase Reaktion

Um DNA-Fragmente mit „blunt ends“ zu erzeugen oder „sticky ends“ von DNA-Fragmenten partiell aufzufüllen wurde das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I (Gibco-BRL) verwendet. Aufgrund der 5'-3' Aktivität der Polymerase können mit dem Klenow-Fragment nur 5'-überstehende Enden aufgefüllt werden. Für die Reaktion wurden die DNA-Fragmente für 30 min bei einer Temperatur von 37 °C mit 1 U pro μ g DNA in Gegenwart von jeweils 2,5 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP inkubiert.

2.8.7 Dephosphorylierung von DNA

Um bei Ligationen die Rezirkularisierung des Vektors zu verhindern, wurden die 5'-Phosphatreste des Vektor-Fragments mit Hilfe von alkalischer Phosphatase (CIAP) abgespalten. Hierfür wurden 1 µg des linearisierten Vektors mit 1 U CIAP für 45–60 min bei 37 °C behandelt. Die alkalische Phosphatase wurde anschließend durch eine PCIA Extraktion inaktiviert und die DNA durch eine Ethanol-fällung präzipitiert.

2.8.8 Ligation von DNA

Für die Ligation von Vektor- und Fragment-DNA wurde T4-Ligase (Gibco-BRL) verwendet. Die Ligation erfolgte in einem Volumen von 10 µl und wurde über Nacht in einem Wasserbad bei einer Temperatur von 14,8 °C durchgeführt. Pro Ligationsansatz wurde 0,1 µg Vektor-DNA eingesetzt. Die Fragment-DNA wurde in fünf bis zehnfachen molaren Überschuß eingesetzt.

2.8.9 Agarose-Gelelektrophorese

Auftrennung von DNA in Agarosegelen

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte je nach Größe der zu trennenden Fragmente in 0,7 bis 1,2 % (w/v) Agarosegelen in Gegenwart von 0,5 µg/ml Ethidiumbromid bei einer Spannung von 100 V für 1–3 h. Zum Auftragen wurden die DNA-Proben mit 1/6 Volumen Ladepuffer (15 % (w/v) Ficoll 400, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau) versetzt. Als Laufpuffer wurde 1 × TBE (89 mM Tris-Borat, pH 8,3, 2 mM Na₂EDTA) verwendet. Die Elektrophorese wurde in Gibco-BRL Horizon 58 und Horizon 11 • 14 Elektrophoresekamern durchgeführt. Als Größen-Standard diente mit den Restriktionsenzymen EcoRI und HindIII geschnittene DNA des Bakteriophagen λ. Dieser Marker enthält Fragmente mit einer Länge von 21.226, 5.148, 4.973, 4.268, 3.530, 2.027, 1.904, 1.584, 1.375, 947, 831, 564 und 125 bp. Bei der Auftrennung von DNA-Fragmenten, die kleiner als 1 kb sind wurde 100 bp Marker der Firma MBI-Fermentas verwendet. Der Marker enthält DNA-Fragmente einer Länge von 3.000, 2.000, 1.500, 1.200, 1.031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 und 100 bp.

Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden aus Agarosegelen mit Hilfe des Nucleotrap Kits der Firma Machery & Nagel isoliert. Die DNA wird dabei in Gegenwart von hohen Salz- und Ethanolkonzentrationen an oberflächenbehandelte Silikatpartikel gebunden und kann mit H₂O oder TE eluiert werden. Die DNA wurde nach dem Protokoll des Herstellers aus den Agarosegelen eluiert.

Auftrennung von RNA in Agarosegelen

RNA wurde in denaturierenden formaldehydhaltigen Agarosegelen aufgetrennt. Für die Herstellung der Gele wurden 1,125 g Agarose in 62,5 ml ddH₂O mit 750 µl 1 M NaH₂PO₄ Puffer (pH 6,5) durch Aufkochen gelöst. Nach dem Abkühlen der Lösung auf 60 °C wurden 6 µl Ethidiumbromid (5 mg/ml) und 12,5 ml Formaldehyd (37 %) zugegeben. Die Mischung wurde dann auf einen 14 × 11 cm großen Gelträger gegeben. Das Gel wurde nach dem Erstarren mit Laufpuffer (10 mM NaH₂PO₄, pH 6,5) überschichtet.

Zum Auftragen wurden 15 µg RNA mit 15 µl Denaturierungspuffer (250 µl Formamid, 75 µl Formaldehyd (37 %), 5 µl 10 mM NaH₂PO₄, pH 6,5 und 45 µl ddH₂O) gemischt und für 15 min bei 50 °C im Heizblock denaturiert. Die Proben wurden anschließend auf Eis gestellt und mit 3 µl Probenpuffer (3,8 ml Glycerin 87 % (v/v) mit 300 µl 1 M NaH₂PO₄, pH 6,5 und 25 mg Bromphenolblau) versetzt.

Die RNA wurde bei einer Spannung von 100 V für 4–6 h aufgetrennt. Als Elektrophoresepuffer wurde 10 mM NaH_2PO_4 (pH 6,5) verwendet. Der Puffer wurde während der Elektrophorese mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe von der Kathode (–) zur Anode (+) gepumpt, damit der pH-Wert des Puffers stabil bleibt.

2.8.10 Koloniehybridisierung

Die Koloniehybridisierungen wurden nach einem modifizierten Verfahren von [Grunstein & Hogness \(1975\)](#) durchgeführt. Um eine Menge von 2.000 transformierten *E.coli* pro Petrischale zu erzielen, wurde eine Probetransformation mit verschiedenen Verdünnungen der verwendeten Bank durchgeführt, um die Menge der dafür erforderlichen Plasmid-DNA zu bestimmen. Die transformierten *E.coli* Zellen wurden auf LB Medium mit 40 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die *E.coli* Kolonien auf Nylonfilter übertragen. Die Filter werden dazu auf die Agaroberfläche gelegt. Die Position der Filter auf der Agaroberfläche wurde durch unsymmetrisches Einstechen mit einer sterilen Kanüle markiert. Das Filter wurde dann mit Hilfe einer Pinzette abgezogen und mit der Kolonieseite nach oben für 5 min auf ein mit 10 % (w/v) SDS-Lösung durchtränktes Whatman 3MM Filterpapier gelegt.

Um überschüssige SDS-Lösung zu entfernen wurde das Filter kurz auf trockenes Whatman 3MM Papier gelegt. Danach wurde die DNA der lysierten *E.coli* Zellen auf dem Filter fixiert. Dazu wurde das Filter auf ein mit Southern I Lösung (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) getränktes Whatman 3MM Papier gelegt und für 5 min inkubiert. Anschließend wird das Filter für 15 min auf ein mit Southern II Lösung (0,5 M Tris-HCL, pH 7,4, 1,5 M NaCl) getränktes Whatman 3MM Papier gelegt. Auf dem Filter verbliebene Zelltrümmer wurden dann durch Waschen in 2 \times SSC Lösung entfernt (20 \times SSC: 3 M NaCl, 0,3 M Trisnatriumcitrat, pH 7,0). Nach dem Trocknen wurden die Filter für 2 h bei 80 °C im Trockenschrank gebacken, um die DNA kovalent auf der Membran zu fixieren.

2.8.11 PCR – Polymerase Chain Reaction

Enzyme und Reaktionsbedingungen

Für diese Arbeit wurden zwei verschiedene thermostabile DNA-Polymerasen verwendet: Mit der *Pfu*-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* (Stratagene) wurden DNA-Abschnitte amplifiziert, die für die Herstellung von Konstrukten dienten, die in *S.pombe* exprimiert werden sollten. Die *Pfu*-Polymerase hat eine „proof-reading“ Aktivität und zeichnet sich durch eine besonders geringe Fehlerrate aus. Alle anderen PCR-Reaktionen wurden mit Pro-HA Polymerase (Eurogentec) durchgeführt.

Sofern nicht anders angegeben, wurden die PCR-Reaktionen in einem Volumen von 100 μl durchgeführt. Von den Polymerasen wurden jeweils 2,5 Units pro Reaktion verwendet.

Synthese von Primern und deren Aufreinigung

Die Synthese der Primer für die PCR erfolgte mit einem LKB Gene Assembler Plus nach dem Phosphoamidit-Verfahren. Bei diesem Verfahren wird das Oligonukleotid nach der Synthese mit Hilfe von NH_3 vom Trägermaterial abgespalten. Das Ammoniak wurde durch eine Butanolfällung entfernt. Dazu wurde das in NH_3 gelöste Oligonukleotid mit 9 Volumen 1-Butanol gemischt. Das Präzipitat wird durch Zentrifugieren für 20 min mit 13.000 \times g pelletiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet mit 10 ml 96 % Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Nach dem Aufnehmen in 500 μl ddH₂O wurde die Konzentration photometrisch bestimmt.

Die Konzentration von Primern für die PCR wurde auf 25 pmol/ μl eingestellt. Primer für die Sequenzierung wurden mit ddH₂O auf eine Konzentration von 1 pmol/ μl verdünnt.

Ein Teil der in dieser Arbeit verwendeten Primer wurde von der Firma Metabion bezogen. Sofern dies für die Durchführung der Experimente relevant war, sind diese Primer gesondert gekennzeichnet.

Verwendete PCR-Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten PCR-Primer sind in der Tab.2.5 aufgelistet. Die Sequenzen sind jeweils von 5'- zum 3'-Ende angegeben. Das 5'-Ende der Primer enthält die Sequenz ATAT, die von der Erkennungssequenz (GGATCC) für das Restriktionsenzym BamHI gefolgt wird (Linker). Die Primer Srp2 RBD2 5', Srp2 RRD 5', Srp2 RBD1 3' und Srp1 RBD1 5' wurden zusätzlich mit der Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym PstI (CTGCAG) ausgestattet.

Tab. 2.5: Tabelle der verwendeten PCR-Primer

Bezeichnung	Sequenz
OL74	5'-ATATGGATCCAGAGAAAGTGCTGCTTCTAA-3'
OL75	5'-ATATGGATCCTTACCATTACAGCAGCGACCT-3'
Srp2 5'	5'-ATATGGATCCATGTCGGAGACTAGATTGTTTG-3'
Srp2 3'	5'-ATATGGATCCCTTAAGAAGCAGCACTTTCTCTAAAG-3'
Srp2 RBD1 3'	5'-ATATGGATCCCTGCAGAGAAGCAGCACTTTCTCTAAAG-3'
Srp2 RBD2 5'	5'-ATATGGATCCCTGCAGAAATACCCCGTCCCGTCGC-3'
Srp2 RBD2 3'	5'-ATATGGATCCCTTAACGACGGCGAGCAGGTGG-3'
Srp2 RRD 5'	5'-ATATGGATCCCTGCAGGATGCCGCTAATGAGCCCCTT-3'
Primer A	5'-ATATGGATCCCTTAACGACGGCGAGCAGGTGG-3'
Primer B	5'-ATATGGATCCGCGTGCAATGCCAAATCGCC-3'
I6 5'	5'-ATATGGATCCTGTGATAGTGGCGATTGCGC-3'
I6 3'	5'-ATATGGATCCTGTGATAGTGGCGATTGCGC-3'
pML1 3'	5'-ATATGGATCCATTTTTTTGGGTAGTTGG-3'
pML1 5'	5'-ATATCTGCAGTCGATGAAATTATCATCGCC-3'
Srp1 RBD1 5'	5'-ATATGGATCCCTGCAGTAGCCGTCCAGAATCTCCG-3'
Srp1 RBD1 3'	5'-ATATGGATCCATGAGTCGCAGAAGCCTTCGTACCC-3'
Exon 7 3'	5'-ATATGGATCCGTCGACTCCACAATCAAACGGAACCGG-3'
ΔGAA 5'	5'-ATATGGATCCCTCGAGTTTAGAGAAAGTGCTGCTTCT- -AAG-3'
ΔGAA 3'	5'-ATATGGATCCCTCGAGGCGAGCAGGTTCTACAACAAT- -AC-3'

Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung von PCR-Produkten, die in Vektoren ligiert oder als Sonde verwendet werden sollten, erfolgte mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits der Firma Qiagen. Die Aufreinigung der Produkte erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers.

Wenn die Produkte nur in einem Agarosegel aufgetrennt werden sollten, wurde nur das Paraffin-Öl abgetrennt und das Produkt durch eine Ethanolfällung gereinigt.

RT-PCR

Die RT-PCR Reaktionen wurden mit Hilfe von Combscript Polymerase (PAN Systems) durchgeführt. Diese thermostabile DNA-Polymerase wurde aus dem Bakterium *Thermus thermophilus* isoliert. *Th* Polymerase hat in Gegenwart von Mn^{2+} Ionen Reverse Transkriptase Aktivität und in Gegenwart von Mg^{2+} Ionen DNA-Polymerase Aktivität.

Für die reverse Transkription wurden ca. 250 ng *S.pombe* mRNA, 2 μ l $10 \times NH_4$ Reaktionspuffer, 2 μ l dNTP Mix (2,5 mM), 4 μ l 3'-Primer (25 pmol/ μ l), 2 μ l $MnCl_2$ in einem dünnwandigen 0,5 ml Reaktionsgefäß gemischt und mit ddH₂O auf ein Volumen

von 19,5 μ l eingestellt. Der Ansatz wurde für 5 min bei 65 ° C inkubiert und dann auf 37 ° C abgekühlt. Nach Zugabe von 0,5 μ l Combiscript Polymerase (2,5 U) wurde der Ansatz für 30 min bei 65 ° C inkubiert.

Für die PCR-Reaktion wurden dem Ansatz anschließend 16 μ l 5 \times Chelating Buffer, 3 μ l 50 mM MgCl₂ und 4 μ l 5'-Primer (25 pmol/ μ l) zugegeben und mit ddH₂O auf ein Volumen von 100 μ l eingestellt. Nach dem Übersichten mit 50 μ l Paraffin-Öl wurde die PCR Reaktion durchgeführt, bestehend aus 40 Zyklen der folgenden Schritte: 20 sec Denaturierung bei 95 ° C, 30 sec Annealing bei 55 bis 60 ° C und 1 min Primer-Extension bei 72 ° C. Die PCR-Produkte wurden anschließend gefällt und in einem Agarosegel aufgetrennt.

2.8.12 Nukleinsäure Hybridisierung

Transfer von DNA auf Nylonmembran (Southern)

Der Transfer von DNA auf eine Nylonmembran erfolgte nach dem Saugdruckverfahren von [Southern \(1975\)](#). Nach der Gelelektrophorese wurde das Agarosegel für 30 min in 120 mM HCl geschwenkt. Durch die Salzsäure wird die DNA depurinisiert und es werden Einzelstrangbrüche in der DNA erzeugt, was den Transfer von großen DNA Fragmenten auf die Membran erleichtert. Danach wurde die DNA denaturiert, indem das Gel für 30 min in Southern I Lösung (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) geschwenkt wurde. Anschließend wurde das Gel für 30 min in Southern II Lösung (0,5 M Tris-HCL, pH 7,4, 1,5 M NaCl) inkubiert.

Der Transfer der DNA auf die Nylonmembran erfolgte nach dem gleichen Verfahren, das im nächsten Abschnitt für den Transfer von RNA beschrieben ist.

Transfer von RNA auf Nylonmembran (Northern)

Der Transfer und die Fixierung von RNA auf eine Membran wird als Northern-Blot bezeichnet. Die RNA wurde dazu in einem denaturierendem Agarosegel aufgetrennt. Der Transfer der RNA auf die Membran erfolgte mit Hilfe der folgenden Apparatur:

Eine Glasplatte wurde auf eine Plastikschiene gelegt, in der sich 20 \times SSC (3 M NaCl, 0,3 M Trisnatriumcitrat, pH 7,0) befinden. Auf die Glasplatte wurden zwei Lagen Whatman 1 mm Papier gelegt, und zwar so, daß die beiden Enden des Papiers in das 20 \times SSC tauchten und als „Docht“ wirken konnten.

Das Agarosegel wurde auf dem Whatmanpapier plaziert und die Nylonmembran auf das Gel gelegt. Auf die Membran wurden 3 Lagen mit 20 \times SSC getränkten Whatman 3MM Papier, 3 Lagen trockenes Whatman 3MM und mehrere Lagen saugfähiges Papier gelegt. Zuletzt wurde der Aufbau mit einem Gewicht beschwert. Der Transfer der RNA auf die Membran erfolgte über Nacht. Am nächsten Tag wurde die Membran getrocknet und die RNA auf der Nylonmembran kovalent fixiert. Dazu wurde die Membran für 2 h bei 80 ° C im Trockenschrank gebacken.

Radioaktive Markierung von DNA

DNA-Fragmente wurden mit dem Amersham Multiprime DNA Labeling System (RP1601Z) nach dem Protokoll des Herstellers mit α [³²P]dCTP markiert. Die Markierung erfolgt nach der Random Priming Methode, bei der Hexanukleotide mit zufälliger Sequenz an die denaturierte DNA angelagert werden und als Primer für das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I von *E.coli* dienen.

Für die Markierung wurden bis zu 100 ng DNA in einem Volumen von 28 μ l eingesetzt. Die DNA wurde in einem kochenden Wasserbad für 5 min denaturiert und anschließend in einem Eisbad abgekühlt. Dann wurden 10 μ l Reaktionspuffer, 5 μ l Primer (Gemisch aus Hexanukleotiden und BSA), 5 μ l α [³²P]dCTP und 2 μ l Klenow-Polymerase (2 U) hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 60 min bei 37 ° C in einem Heizblock inkubiert. Die nicht eingebauten Nukleotide wurden mit dem QIAquick Nucleotide Removal

Kit (Qiagen) von der markierten DNA getrennt. Für die Hybridisierung wurde die Sonde für 5 min in einem kochendem Wasserbad denaturiert.

Hybridisierung von DNA und RNA

Die Nylonmembran mit der fixierten DNA oder RNA wurde zunächst in einer Lösung aus $6 \times \text{SSC}$, 0,2 % Ficoll, 0,2 % Polyvinylpyrrolidon, 0,2 % BSA, 1 % SDS und 0,1 mg/ml denaturierter Kalbs-Thymus-DNA für 3 h im Wasserbad bei 42°C inkubiert. Dann wurde die Nylonmembran in eine Lösung aus $6 \times \text{SSC}$, 1 % SDS, 0,1 mg/ml Kalbs-Thymus-DNA, 30–50 % Formamid und der radioaktiv markierten DNA-Probe gegeben und darin über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde unspezifisch an der Membran gebundene Sonde durch Waschen in $10 - 0,1 \times \text{SSC}$ mit 0,2 % SDS entfernt. Die Membran wurde anschließend getrocknet und in einer Autoradiographiekassette bei -80°C für 1 bis 3 Tage auf einem Röntgenfilm exponiert.

Autoradiographie

Für die Detektion von radioaktiv markierten DNA-Fragmenten wurden Kodak X-OMATTM AR Filme verwendet. Southern- und Northern Blots wurden je nach Aktivität für 24 bis 72 h auf dem Röntgenfilm exponiert.

2.8.13 DNA Sequenzierung

Denaturierung doppelsträngiger DNA

Die Sequenzierung von doppelsträngiger DNA erfolgte mit dem Sequenase 2.0 Kit (United States Biochemical) nach dem Kettenabbruchverfahren von [Sanger et al. \(1977\)](#). Die doppelsträngige DNA wurde durch alkalische Denaturierung und eine anschließende Ethanolfällung für die Sequenzierung vorbereitet. Dazu wurden bis zu 5 µg Plasmid DNA mit 4 µl 1 N NaOH und 1,6 µl 25 mM EDTA Lösung gemischt und mit ddH₂O auf ein Volumen von 24 µl gebracht. Der Ansatz wurde nun für 30 min in einem Wasserbad bei 37°C inkubiert. Dann wurde die DNA durch Zugabe von 2 µl 3 M Natriumacetat Lösung (pH 5,0) und 60 µl 96 % Ethanol über Nacht bei -20°C gefällt. Nach dem Zentrifugieren für 15 min mit 13.000 Upm bei 4°C wurde die DNA mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 7 µl ddH₂O gelöst.

Sequenzreaktion nach Sanger

Zu der DNA Lösung wurde nun 1 µl Primer (1 pmol/µl) und 2 µl Reaktions-Puffer gegeben. Der Ansatz wurde in einem Wasserbad auf eine Temperatur von 65°C erwärmt. Zum Anlagern des Primers an die einzelsträngige DNA wurde das Wasserbad langsam auf eine Temperatur von 25°C abgekühlt. Danach wurde der Ansatz in ein Eisbad gestellt und 1 µl 0,1 M DTT Lösung sowie 2 µl 1 \times Labeling-Mix (1,5 µM dGTP, dCTP und dTTP) hinzugegeben.

Durch die Zugabe von 0,5 µl $\alpha[^{35}\text{S}]\text{dATP}$ und 2 µl Sequenase (1:8 in 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 5 mM DTT, 0,5 mg/ml BSA verdünnt) wurde die Labeling Reaktion gestartet. Nach 2 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Gemisch auf vier Reaktionsgefäße aufgeteilt, in die zuvor jeweils 2,5 µl Terminationsmix (80 µM ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP in 50 mM NaCl) gegeben wurden. Anschließend wurden die vier Ansätze für 5 min bei 37°C inkubiert. Durch die Zugabe von jeweils 5 µl Stop-Mix (95 % Formamid, 20 mM EDTA, 0,05 % Bromphenolblau, 0,05 % Xylencyanol-FF) wurde die Reaktion beendet.

Auftrennung im Polyacrylamidgel

Die Produkte der Sequenzreaktion wurden mit einer Sequenzgelapparatur der Firma Gibco-BRL (S20) aufgetrennt. Die Auftrennung der DNA erfolgte in einem 0,4 mm dicken 6%igen Polyacrylamidgel mit 6 M Harnstoff. Das Gel wurde aus 55 g Harnstoff, 10 ml 10 × TBE, 15 ml 40 % Acrylamid-Stammlösung und 30 ml ddH₂O hergestellt. Um die Polymerisation des Gels zu starten wurden 630 µl 10 % (w/v) Ammoniumpersulfat-Lösung und 28 µl N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (Temed) hinzugegeben.

Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel für 2 min bei 80 °C denaturiert. Die Auftrennung der Proben erfolgte für 1,5-6 h bei einer Spannung von 1800-2500 V und 60 Watt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel auf Whatman 3 MM Papier getrocknet und in einer Autoradiographie-Kassette für 1-3 Tage bei -80 °C auf einem Röntgenfilm exponiert.

Primer für die Sequenzierung des *srp2* Gens

Die Sequenzierprimer, die für die Sequenzierung des *srp2* Gens und der *srp2* cDNA verwendet wurden sind in der Tab.2.6 angegeben.

Tab. 2.6: Oligonukleotide für die Sequenzierung von *srp2*

Bezeichnung	Sequenz
L026	5'-TCGCGAGTCGCTTGAGG-3'
U148	5'-ACGCTCGCGATGCTCGT-3'
L148	5'-ACGAGCATCGCGAGCGT-3'
U164	5'-TACGGTCAAATCCTTGATTGC-3'
L259	5'-TGCGACGGGGACGGGGG-3'
L464	5'-TCCTTCAGGTCCTGCCAACTG-3'
U691	5'-CCGTCGTGGTGGTCGCG-3'
L872	5'-TCATGGGAAGGGCGTCC-3'
U1290	5'-TCCTTTGTCTGTGATGTATTGA-3'
pGAD424 3'	5'-GAGATGGTGCACGATCG-3'
pUC18 Universe	5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'
pUC18 Reverse	3'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

2.9 Isolierung der Domänen von Srp1 und Srp2 mit Hilfe der PCR

Die einzelnen Domänen von *srp1* und *srp2* wurden mit Hilfe der Primer isoliert, die in der Tabelle 2.5 angegeben sind. Die Primer wurden in den folgenden Kombinationen verwendet: Die erste RNA-Bindungsdomäne von Srp2 wurde mit Hilfe der Primer Srp2 5' und Srp2 RBD1 3' isoliert. Für die Isolierung der ersten und der zweiten RNA-Bindungsdomäne wurden die Primer Srp2 5' und Srp2 RBD2 2' und für die argininreiche Domäne die Primer Srp2 RRD 5' und Srp2 3' verwendet. Die RNA-Bindungsdomäne von Srp1 wurde mit den Primern Srp1 RBD1 5' und Srp1 RBD1 3' isoliert.

Für die PCR-Reaktionen wurde *Pfu* Polymerase verwendet, um die Anzahl von PCR-Fehlern zu reduzieren. Sämtliche PCR-Produkte wurden nach der Amplifikation mit dem QIAquick PCR-Purification Kit aufgereinigt, mit dem Restriktionsenzym BamHI geschnitten und in den Vektor pUC19 ligiert. Nach der Ligation wurden die PCR-Produkte sequenziert, um sie auf Fehler zu überprüfen.

Für die Deletion der zweiten RNA-Bindungsdomäne von Srp2 wurde die erste RNA-Bindungsdomäne von Srp2 mit der argininreichen Domäne fusioniert. Zu diesem Zweck wurden die 5'-Enden der Primer zusätzlich mit der Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym PstI ausgestattet. Die PstI Schnittstellen wurden verwendet um das 3'-Ende der

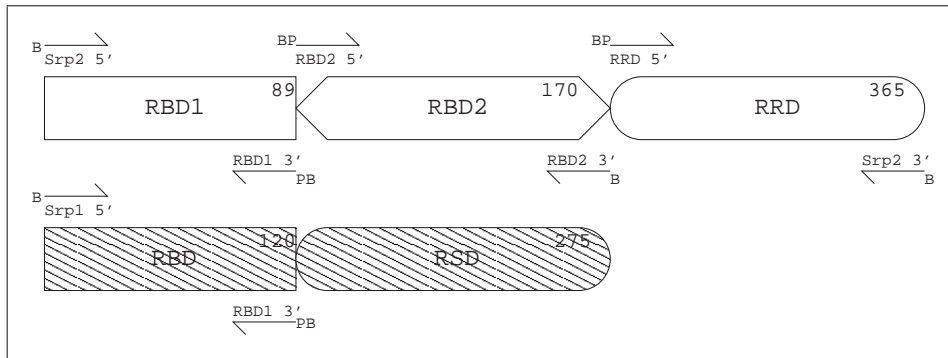


Abb. 2.9: Schematische Darstellung der Isolierung der Domänen von Srp1 und Srp2 mit Hilfe der PCR. Die Position der dabei verwendeten PCR-Primer ist relativ zur Aminosäuresequenz angegeben. Die Primer wurden mit BamHI-Linkern (B) versehen, damit die PCR-Produkte in den Vektor pUC19 ligiert werden konnten. Die PstI Schnittstelle (P) wurde für die Fusion der ersten RNA-Bindungsdomäne von Srp2 mit der argininreichen Domäne (RRD) und der RNA-Bindungsdomäne von Srp1 (schraffiert) mit der RBD2 und der RRD von Srp2 verwendet.

RBD1 und das 5'-Ende der argininreichen Domäne von Srp2 miteinander zu verbinden. Nach der gleichen Vorgehensweise wurde die RNA-Bindungsdomäne von Srp1 mit der zweiten RNA-Bindungsdomäne und der argininreichen Domäne von Srp2 verbunden.

2.10 Fusion des *srp2* Gens mit dem *lacZ* Gen von *E.coli*

Für die Fusion des *srp2* Gens mit dem *lacZ* Gen von *E.coli* wurden die folgenden Abschnitte des *srp2* Gens amplifiziert: Mit dem Primerpaar Srp2 5' und Exon7 3', wurde die Region vom Startcodon bis zum Exon 7 (740 bp) des *srp2* Gens isoliert. Die Primer waren mit BamHI Linkern versehen, so daß das PCR-Produkt in die BamHI Schnittstelle des Vektors pUC19 ligiert werden konnte. Dabei wurde der Vektor pUC19-E1E7 erhalten (Abb.2.10).

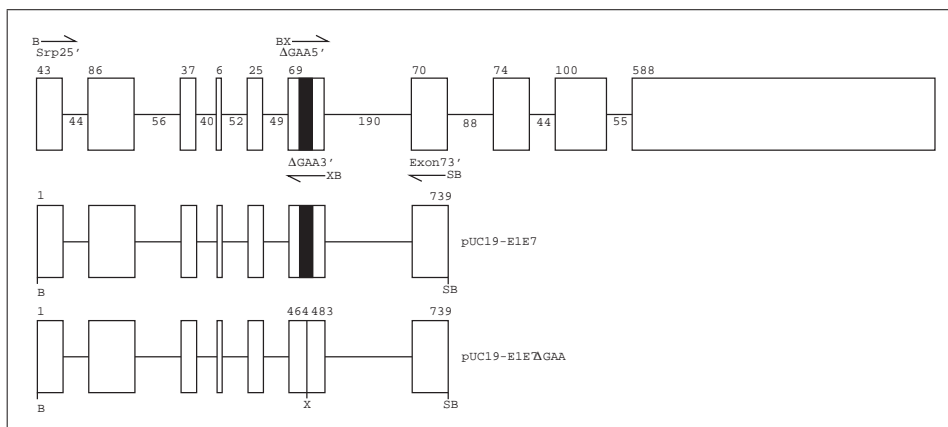


Abb. 2.10: Schematische Darstellung der PCR-Reaktionen für die Fusion von *srp2* mit dem *lacZ* Gen von *E.coli*. Die Primer wurden mit BamHI Linkern versehen (B), damit die PCR-Produkte in den Vektor pUC19 ligiert werden konnten. Für die Fusion mit dem *lacZ* Gen enthält der Primer Exon7 3' eine SalI Schnittstelle (S). Die purinreiche Sequenz in Exon 6 ist durch ein schwarzes Rechteck symbolisiert. Zur Deletion der purinreichen Sequenz wurden die Primer ΔGAA 5' und ΔGAA 3' verwendet. Diese Primer enthalten eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym XhoI (X), mit dessen Hilfe die PCR-Produkte aus der Region vor und hinter der purinreichen Sequenz zusammengefügt wurden.

Mit dem Primerpaar Srp2 5' und Δ GAA 3' wurde die Region vom Startcodon bis zum Beginn der purinreichen Sequenz in Exon 6 amplifiziert (Position 464). Mit dem Primerpaar Δ GAA 5' und dem Primer Exon7 3' wurde der Abschnitt isoliert, der auf die purinreiche Sequenz in Exon 6 folgt (Position 485-740). Diese PCR-Produkte wurden in den Vektor pUC19 ligiert und mit Hilfe der XhoI Schnittstelle der Primer Δ GAA 3' und Δ GAA 5' miteinander verbunden. Dabei wurde der Vektor pUC19-E1E7 Δ GAA erhalten. Auf diese Weise wurde die purinreiche Sequenz in Exon 6 deletiert (Abb.2.10).

Die BamHI Fragmente aus den Vektoren pUC19-E1E7 und pUC19E1E7 Δ GAA wurden nun in den Vektor pRIP2-S* umklontiert. Dabei wurden die Vektoren pRIP2-S*-E1E7 und pRIP2-S*-E1E7 Δ GAA erhalten. Aus dem Vektor pUCK_D4.lacZ.L29-2 (Witt, 1993) wurde nun ein 3.087 bp großes BamHI Fragment des *lacZ* Gens von *E.coli* isoliert und in den Vektor pRIP2 ligiert. Dieser Vektor wurde pRIP2-LacZ genannt (Abb.2.11).

Für die Fusion mit dem *lacZ* Gen wurde aus den Vektoren pRIP2-S*-E1E7 und pRIP2-S*-E1E7 Δ GAA ein 2.000 kb großes PstI/SalI Fragment isoliert und in den Vektor pRIP2-LacZ ligiert. Die auf diese Weise erstellten Konstrukte sind in der Abb.2.11 gezeigt.

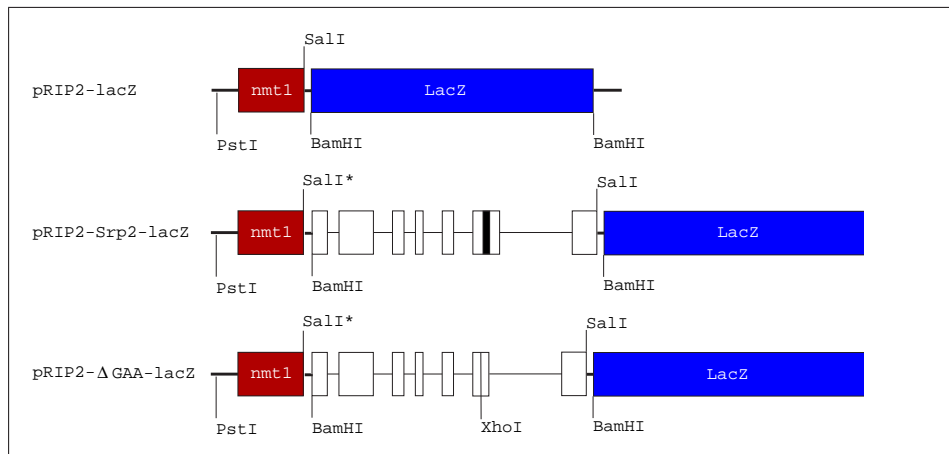


Abb. 2.11: Schematische Darstellung der Fusion des *srp2* Gens mit dem *lacZ* Gen von *E.coli*. Die für die Fusion mit dem *lacZ* Gen relevanten Restriktionsschnittstellen sind jeweils angegeben. Alle Konstruktionen sind mit dem *nmt1* Promotor von *S.pombe* fusioniert. Die SalI* Schnittstelle, die auf den *nmt1* Promotor folgt, stammt aus dem pRIP2-S* Vektor und wurde zur Korrektur des Leserasters mit Hilfe einer Klenow-Polymerase-Reaktion aufgefüllt (siehe S.15).

2.11 Gerichtete Mutagenese der *srp2* cDNA

Zur Erzeugung von Mutationen in der *srp2* cDNA wurde das MutaGene M13 *in vitro* Mutagenese Kit 2.0 der Firma Biorad verwendet. Das Kit ermöglicht die gezielte Mutagenese einer DNA-Sequenz mit Hilfe des Bakteriophagen M13 nach dem Verfahren von Kunkel *et al.* (1987). Die Mutagenese wurde nach der Vorschrift des Herstellers durchgeführt.

Für die Mutagenese wurde die *srp2* cDNA in die BamHI Schnittstelle des Vektors M13mp19 ligiert. Nach der Ligation lag das offene Leseraster der *srp2* cDNA in der Orientierung von HindIII (ATG) nach EcoRI (TAA) im Vektor vor. Die Oligonukleotide wurden deshalb vom nicht-kodierenden Strang der cDNA Sequenz abgeleitet.

Die Sequenzen der Oligonukleotide wurden so ausgewählt, daß durch die Mutagenese neue Restriktionsschnittstellen in der *srp2* cDNA entstehen, damit sich die Mutationen leichter nachweisen lassen. Die Sequenzen und Restriktionsschnittstellen der Oligonukleotide sind in der Tabelle 2.7 angegeben.

Die Oligonukleotide wurden einzeln oder in Kombination verwendet, um Doppelmutationen zu erzeugen. Für die Mutagenese der 14 Tyrosine, die sich in der argininreichen

Domäne von Srp2 befinden wurden die Oligonukleotide Y1–Y4, Y5–Y8, Y9–Y11 und Y12–Y14 miteinander kombiniert. Die Sequenzen der mutierten cDNAs wurden durch eine Sequenzierung überprüft. Nach der Mutagenese wurden die mutierten cDNAs in die BamHI Schnittstelle des Vektors pUC18/19 umklont.

Tab. 2.7: Oligonukleotide für die Mutagenese der *srp2* cDNA

Bezeichnung	Sequenz	
RBD1*	5'-ACGATATCTTGAACATTTTGAAC-3'	HpaI
RBD2*	5'-TACGCATTACATTCGCGACGTTCTG-3'	PstI
SR1*	5'-ACGTCTAGGAGCAGGTGCCCCGGGCA-3'	SmaI
SR2*	5'-TGGAGCACGTCGACGGAAGCGGGC-3'	Sall
Y1–Y4	5'-TTCATCATCTCTGCCCGGACGAAAAGCG- TCGCGACGGAAATCGCCTCCTCTACGAAAATC-3'	NruI
Y5–Y8	5'-TCTAAACTCATCGCGACCACCACGACGA- AATTCATCACGATTATTACGCCTGAATTCA-3'	EcoRI
Y9–Y11	5'-TCCAGGGCGAAATTCATCACCTCTAGGA- CGACGAAACTCATCATCATGAGGTCGACGAAA-3'	Sall
Y12–Y14	5'-AGGACTACGGCTAAACGCGTCACGTCGA- AACTCATCATCATGGGAAGGGCGTCCATCATC-3'	MluI

2.12 Differential Display

Für die Untersuchung von RNA Proben mit Hilfe des Differential Display wurde das RNAimageTM Kit von der Firma GenHunter verwendet. Die Durchführung des Differential Display erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die für die Anwendung dieses Kits erforderlichen Veränderungen sind im folgenden Abschnitt beschrieben.

2.12.1 DNase I Behandlung von RNA-Proben

Für die DD-RT-PCR Reaktion wurde die aus den *S.pombe* Zellen isolierte Gesamt-RNA durch eine DNase I Behandlung von chromosomaler *S.pombe* DNA befreit, die durch den Aufschluß der Zellen mit Glasperlen in die RNA-Proben gelangt ist. Die Reinigung der Gesamt-RNA erfolgte mit dem GenHunter Message-CleanTM Kit. Es wurden bis zu 50 µg Gesamt-RNA in einer Reaktion aufgereinigt.

Die Aufreinigung der Gesamt-RNA erfolgte in einem Volumen von 50 µl. Dazu wurden 16 µl RNA (3 µg/µl) mit 5,7 µl 10 × Reaktionspuffer und 34 µl H₂O gemischt. Anschließend wurde 1 µl DNase I (10 U/µl) hinzugegeben und für 60 min bei 37 ° C inkubiert.

Anschließend wurden 40 µl Phenol/Chloroform hinzugegeben und gemischt. Der Ansatz wurde nun für 10 min auf Eis inkubiert und 5 min bei 4 ° C mit 13.000 Upm zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und mit 200 µl 96 % Ethanol und 5 µl 3 M Natriumacetat gefällt (mindestens 1 h bei -80 ° C). Dann wurde für 20 min mit 13.000 Upm bei 4 ° C zentrifugiert. Der Überstand wurde nun vorsichtig entfernt und das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen. Die RNA wurde im Vakuumkonzentrator getrocknet und anschließend in 30 µl DEPC-dH₂O aufgenommen. Die Konzentration wurde auf 1 µg/µl eingestellt und die RNA in Aliquots zu je 3 µg bei -80 ° C eingefroren.

Nach der DNase I Behandlung wurde überprüft, ob die RNA intakt geblieben ist. Dazu wurden jeweils 2-3 µg auf ein denaturierendes Agarosegel aufgetragen und aufgetrennt.

2.12.2 Reverse Transkription der Gesamt-RNA

Die reverse Transkription der Gesamt-RNA wurde in einem Reaktionsvolumen von 20 µl mit Hilfe von MMLV Reverser Transkriptase durchgeführt. Dazu wurden in einem dünnwandigen 0,5 ml Reaktionsgefäß 9,4 µl ddH₂O, 4 µl 5 × RT-Reaktionspuffer, 1,6 µl

250 mM dNTP Lösung, 2 μ l *S.pombe* RNA (DNA-frei, 0,1 μ g/ μ l, frisch verdünnt) und 2 μ l (2 μ M) des jeweiligen H-T₁₁M Primers vermischt.

Das Gemisch wurde nun für 5 min bei 65 °C denaturiert. Der Ansatz wurde abgekühlt und für das Annealing der Primer für 10 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 1 μ l (100 U/ μ l) der MMLV Reverse Transkriptase hinzugegeben und der Ansatz für weitere 50 min bei 37 °C inkubiert. Um die MMLV Reverse Transkriptase zu inaktivieren wurden die Proben anschließend für 5 min auf 75 °C erwärmt. Die Proben wurden danach direkt für die PCR verwendet oder für spätere PCR-Reaktionen bei -80 °C eingefroren.

2.12.3 DDRT-PCR Reaktion

Für die DD-PCR Reaktionen wurde Pro-HA Polymerase von der Firma Eurogentec verwendet. Für die Amplifizierung von DNA-Fragmenten mit 3 Primer-Paar Kombinationen von 8 H-AP Primern zufällig ausgewählter Sequenz wurde eine Mischung aus 88 μ l ddH₂O, 20 μ l 10 \times Pro-HA Polymerase Reaktionspuffer, 16 μ l dNTP Lösung (25 mM), 20 μ l H-T₁₁M Primer (2 μ M), 20 μ l revers transkribierte *S.pombe* RNA, 12 μ l MgCl₂ (25 mM), 2 μ l α -[³²P]dATP (2.000 Ci/mmol) und 2 μ l Pro-HA Polymerase hergestellt. Zu je 18 μ l dieser Mischung wurde je ein HA-P Primer gegeben. Die Ansätze wurden mit 25 μ l Paraffin-Öl überschichtet.

Für die PCR wurden die Proben zunächst für 2 min bei 94 °C denaturiert. Anschließend folgten 40 Zyklen bestehend aus: 2 min Denaturierung bei 94 °C, 30 sec. Annealing bei 40 °C und 30 sec. Primer-Extension bei 72 °C. Danach wurden die Proben noch einmal für 5 min bei 72 °C inkubiert.

Die PCR Produkte wurden in einem 6 % Polyacrylamidgel aufgetrennt. Dazu wurden jeweils 3,5 μ l des PCR-Produkts mit 2 μ l Ladepuffer vermischt, für 2 min bei 80 °C im Wasserbad denaturiert und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde für 3,5 h bei 60 W (1.700 V) durchgeführt, solange bis die Xylenblau Bande das Ende des Gels erreicht hatte. Das Gel wurde anschließend auf ein Whatman 3MM Filterpapier gelegt und bei 80 °C getrocknet. Das Gel wurde dann für 4–8 h auf einem Röntgenfilm exponiert.

2.12.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Polyacrylamidgelen

Um PCR-Produkte aus Polyacrylamidgelen zu isolieren, wurde das folgende Protokoll angewendet: Zunächst wurde die Bande mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Dann wurden 100 μ l H₂O hinzugeben und der Ansatz für 10 min bei RT inkubiert. Das Reaktionsgefäß wurde nun sehr dicht mit ParafilmTM verschlossen und für 15 min in ein kochendes Wasserbad gegeben. Nach dem Abkühlen wurde für 2 min mit 13.000 Upm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß gegeben. Um die eluierte DNA zu fällen wurden 450 μ l 96 % Ethanol, 10 μ l NaOAc pH 5,0 und 5 μ l Glycogen (10 mg/ml) hinzugeben und der Ansatz für 1 h bei -80 °C inkubiert. Danach wurde die DNA für 20 min in der Kühlzentrifuge bei 4 °C mit 13.000 Upm zentrifugiert. Nach dem Entfernen des Überstands wurde das Pellet mit 85 % Ethanol gewaschen und getrocknet. Das Pellet wurde in 10 μ l ddH₂O aufgenommen.

Für die Reamplifizierung des PCR-Produkts wurden jeweils 4 μ l des Eluats mit 18,2 μ l ddH₂O, 4 μ l 10 \times Pro-HA Polymerase Reaktionspuffer, 3,2 μ l dNTP (250 μ M), 4,0 μ l H-AP Primer (2 μ M), 4,0 μ l H-T₁₁M (2 μ M), 2,4 μ l MgCl₂ (25 mM) und 0,2 μ l Pro-HA Polymerase (Eurogentec) vermischt. Der Ansatz wurde mit 40,0 μ l Paraffin-Öl überschichtet. Für die Amplifizierung des eluierten DNA-Fragments wurden die gleichen Bedingungen gewählt wie für die DD-PCR Reaktion.

2.12.5 Sequenzen der Oligonukleotide für die DDRT-PCR

Die DDRT-PCR Reaktionen wurden mit den in der Tab.2.8 aufgeführten Oligonukleotiden durchgeführt. Die Primer enthalten an ihrem 5'-Ende die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym HindIII.

Tab. 2.8: Sequenzen der Oligonukleotide für die DDRT-PCR

Bezeichnung	Sequenz
H-AP1	5'-AAGCTTGATTGCC-3'
H-AP2	5'-AAGCTTCGACTGT-3'
H-AP3	5'-AAGCTTTGGTCAG-3'
H-AP4	5'-AAGCTTCTCAACG-3'
H-AP5	5'-AAGCTTAGTAGGC-3'
H-AP6	5'-AAGCTTGCACCAT-3'
H-AP7	5'-AAGCTTAACGAGG-3'
H-AP8	5'-AAGCTTTTACCGC-3'
H-AP9	5'-AAGCTTCATTCCG-3'
H-AP10	5'-AAGCTTCCACGTA-3'
H-AP11	5'-AAGCTTCGGGTAA-3'
H-AP12	5'-AAGCTTGAGTGCT-3'
H-AP13	5'-AAGCTTCGGCATA-3'
H-AP14	5'-AAGCTTGGAGCTT-3'
H-AP15	5'-AAGCTTACGCAAC-3'
H-AP16	5'-AAGCTTTAGAGCG-3'
H-T11G	5'-AAGCTTTTTTTTTTTTG-3'
H-T11A	5'-AAGCTTTTTTTTTTTTA-3'
H-T11C	5'-AAGCTTTTTTTTTTTTC-3'

2.13 Computerunterstützte Methoden

Die Analyse von Nukleinsäure- und Aminosäuresequenzen erfolgte mit dem Wisconsin GCG Package², Version 8.1 für Digital Unix (DEC OSF/1 V2.0).

Der Vergleich von Nukleinsäure- und Aminosäuresequenzen wurde mit dem Programm Blast 2.0³ (Altschul *et al.*, 1990) durchgeführt. Es wurde die GenBank Datenbank sowie die Datenbank des *S.pombe* Sequencing Projects (PomBase) durchsucht, die am National Center for Biotechnology Information (NCBI)⁴ und am Sanger Centre⁵ zugänglich sind.

Zum Vergleich von kurzen Peptidsequenzen mit der GenBank Datenbank wurde das Programm PeptideSearch am European Molecular Biology Laboratory (EMBL)⁶ eingesetzt. Die Introns von *S.pombe* Genen wurden mit Hilfe des Programms Pombe (Chen & Zhang, 1998) identifiziert.

Der multiple Vergleich von Proteinsequenzen wurden mit dem Programm ClustalX 1.6b⁷ durchgeführt. Die graphische Darstellung der Alignments erfolgte mit dem Programm BoxShade 3.31C⁸.

Die 3dimensionale Struktur von Proteinen wurde aus den Einträgen der Brookhaven PDB-Datenbank⁹ mit Hilfe der Programme Molscrip V2.0.2¹⁰ und Raster3D V2.4j¹¹ berechnet (Kraulis, 1991, Merritt & Bacon, 1997).

²<http://www.gcg.com>

³<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

⁴<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

⁵<http://www.sanger.ac.uk>

⁶<http://www.mann.embl-heidelberg.de/Services/PeptideSearch/PeptideSearchIntro.html>

⁷<http://www-igbmc.u-strasbg.fr/BioInfo/ClustalX/Top.html>

⁸<http://www.ch.embnnet.org>

⁹<http://www.rcsb.org/pdb/>

¹⁰<http://www.avatar.se/molscrip/>

¹¹<http://www.bmsc.washington.edu/raster3d/raster3d.html>

3 Ergebnisse

3.1 Isolierung von SR-Proteinen aus *S.pombe*

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob in der Spaltheife *Schizosaccharomyces pombe* außer dem *srp1* Gen weitere Gene vorkommen, die für SR-Proteine kodieren. Diese Gene sollten isoliert und ihre Funktion *in vivo* charakterisiert werden.

Die SR-Proteine sind RNA-bindende Proteine. Sie bestehen aus ein oder zwei aminoterminalen RNA-Bindungsdomänen und einer carboxyterminalen Domäne, die reich an SR-Dipeptiden ist. In der Abb.3.1 ist ein Vergleich von fünf SR-Proteinen aus dem Menschen dargestellt, die zwei RNA-Bindungsdomänen enthalten.

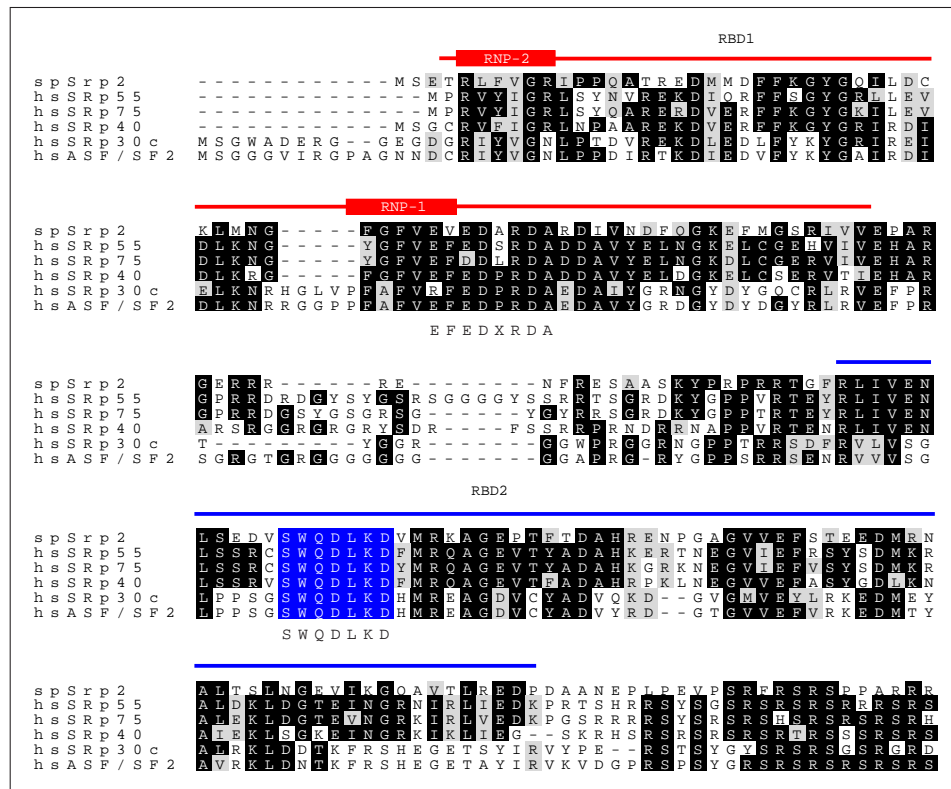


Abb. 3.1: Sequenzvergleich von SR-Proteinen aus dem Menschen, die zwei RNA-Bindungsdomänen enthalten. Es sind nur die RNA-Bindungsdomänen gezeigt. Die RBDs sind durch Linien markiert. Das RNP-2 und das RNP-1 Motiv ist grau gekennzeichnet. Die Signatursequenzen der SR-Proteine EFEDXRDA und SWQDLKD sind angegeben. Die Sequenzen wurden aus den folgenden Einträgen der SwissProt Datenbank entnommen: SRp30c, SP#Q13242; SRp40, SP#Q13243; SRp55, SP#Q13247; SRp75, SP#Q08170; ASF/SF2 SP#Q07955.

Die RNA-bindenden Domänen der SR-Proteine bestehen aus ca. 80 Aminosäuren und haben ein RNA-Erkennungs-Motiv (RRM, RNA-recognition motif), das sich aus zwei kurzen Sequenzen zusammensetzt, die als RNP-1 und RNP-2 Motiv bezeichnet werden. Diese Sequenzmotive enthalten aromatische Aminosäuren, die für die Wechselwirkung mit der RNA benötigt werden und deshalb in allen RNA-bindenden Proteinen gut konserviert sind (Birney *et al.*, 1993).

Des weiteren haben die RNA-Bindungsdomänen von SR-Proteinen zwei typische Signatursequenzen: In der ersten RNA-Bindungsdomäne folgt auf das RNP-1 Motiv die Sequenz EFEDXRDA. In der zweiten RNA-Bindungsdomäne befindet sich das Sequenzmotiv SWQDLKD. Es ist in allen SR-Proteinen mit zwei RNA-Bindungsdomänen konserviert und absolut invariabel (Abb.3.1). Welche Bedeutung diese Sequenzen für die Funktion der SR-Proteine haben ist jedoch nicht bekannt.

3.1.1 Isolierung der *srp2* cDNA

Um weitere SR-Proteine von *S.pombe* zu finden, wurden verschiedene Datenbanken nach Proteinsequenzen durchsucht, die das SWQDLKD Motiv enthalten. Die Suche wurde mit dem Programm PeptideSearch¹ durchgeführt. Dabei wurde eine partielle cDNA Sequenz von *S.pombe* gefunden, die in der GenBank Datenbank unter der Nummer #D89163 eingetragen ist.

Das offene Leseraster dieser cDNA kodiert für ein Protein von 361 Aminosäuren, dem der aminoterminal Teil fehlt. Dieses Proteins hat viele Gemeinsamkeiten mit den SR-Proteinen aus dem Menschen: Der aminoterminal Teil der Sequenz besteht aus zwei RNA-Bindungsdomänen, in denen das RNP-1 und RNP-2 Sequenzmotiv vorkommt (Abb.3.2). In den RNA-Bindungsdomänen sind die Sequenzen EVEDARDAR und SWQDLKD enthalten. Wie der Sequenzvergleich in der (Abb.3.1) zeigt, stimmen in den RNA-Bindungsdomänen ca. 51 % der Aminosäuren dieses Proteins mit dem SR-Protein SRp40 überein.

Auf die beiden RNA-Bindungsdomänen folgt eine carboxyterminale Domäne, die aus etwa 180 Aminosäuren besteht und sehr argininreich ist (Abb.3.2, RRD). Am Anfang und am Ende dieser Domäne befinden sich zwei kurze RS-Dipeptid Elemente, die aus einer Abfolge von mehreren SR-Dipeptiden bestehen (Abb.3.2, SR1 und SR2).

Zwischen den SR-Elementen liegt eine Region aus ca. 100 Aminosäuren, in der sich die Sequenz DEYRR elfmal wiederholt (Abb.3.2, unterstrichen). Darin unterscheidet sich dieses Protein von einem typischen SR-Protein, denn in den carboxyterminalen Domänen der SR-Proteine aus dem Menschen kommen wesentlich mehr RS-Dipeptide vor.

Weil dies das zweite Protein der Spaltheife ist, das den SR-Proteinen von höheren Eukaryonten ähnelt, wurde es Srp2 genannt.

Mit Hilfe einer PCR-Reaktion wurde ein Teil von Srp2 aus einer cDNA Bank isoliert. Dafür wurden die Primer OL74 und OL75 verwendet, die am Beginn der zweiten RNA-Bindungsdomäne und am Stopcodon des offenen Leserasters der *srp2* cDNA binden. Beide Primer haben einen Linker mit der Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym BamHI (s. Material und Methoden S.29).

Es wurde ein 860 bp großes PCR-Produkt erhalten, das aufgereinigt und in die BamHI Schnittstelle des Vektors pUC19 ligiert wurde. Das PCR-Produkt wurde als Sonde für eine Koloniehybridisierung verwendet, um die vollständige cDNA aus der Bank zu isolieren. Dafür wurden ca. 50.000 *E.coli* Transformanten ausplattiert.

Es wurden zehn *E.coli* Kolonien gefunden, deren Plasmide mit der Sonde hybridisierten. Die Plasmide wurden aus den *E.coli* Zellen isoliert und mit den Restriktionsenzymen EcoRI und XhoI geschnitten um die Größe der Inserts zu bestimmen. Fünf der isolierten Plasmide hatten ein 1.200 bp großes Insert.

Eines dieser Inserts wurde mit Primern sequenziert, die von der partiellen cDNA Sequenz aus der Datenbank abgeleitet wurden. Das offene Leseraster dieses Inserts ist 1.098 bp lang und kodiert für ein Protein von 40 kDa, das aus 365 Aminosäuren besteht. Die daraus abgeleitete Proteinsequenz ist in der Abb.3.2 gezeigt.

¹<http://www.mann.embl-heidelberg.de/Services/PeptideSearch/PeptideSearchIntro.html>

3.1.2 Isolierung des *srp2* Gens

Das *srp2* Gen wurde mit Hilfe einer Koloniehybridisierung isoliert. Dazu wurden etwa 50.000 *E.coli* Transformanten ausplattiert, die mit einer genomischen *S.pombe* Bank (Barbet *et al.*, 1992) transformiert waren. Als Sonde wurde die gesamte *srp2* cDNA verwendet.

Es wurden sechs *E.coli* Kolonien gefunden, deren Plasmide mit der Sonde hybridisierten. Diese wurden isoliert und mit den Restriktionsenzymen EcoRI, HindIII, NruI und EcoRV geschnitten, um die Inserts zu kartieren. Die Restriktionskarten der Inserts sind in der Abb.3.3 gezeigt.

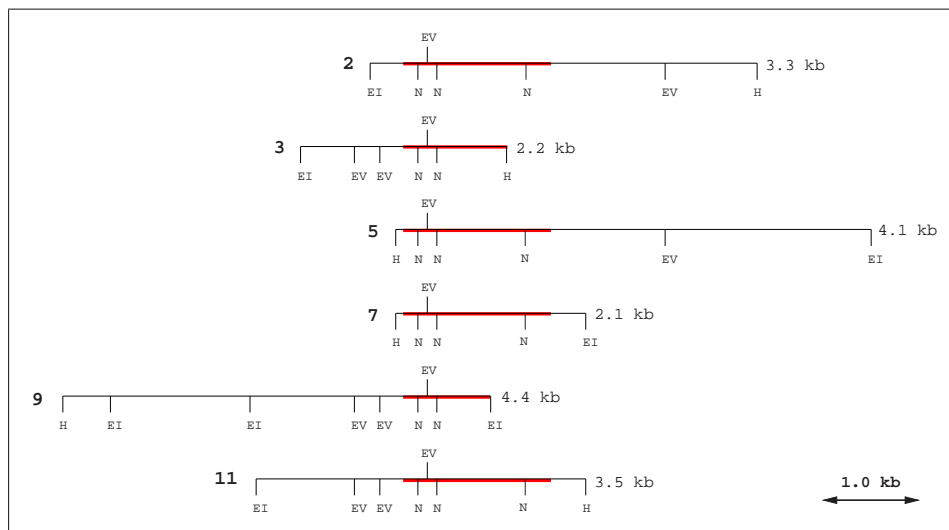


Abb. 3.3: Restriktionskarten der Inserts der Plasmide, die aus der genomischen *S.pombe* Bank isoliert wurden. Es bedeuten: EI = EcoRI, EV = EcoRV, H = HindIII, N = NruI. Die Restriktionsschnittstellen EcoRI und HindIII am Beginn und am Ende der Inserts sind Bestandteil des Polylinkers vom Vektor pUR19. Die Größe der Inserts ist in kb angegeben. Das *srp2* Gen ist durch eine verdickte Linie eingezeichnet.

In der *srp2* cDNA Sequenz kommen insgesamt drei Schnittstellen für das Restriktionsenzym NruI vor. Diese liegen im offenen Leseraster der cDNA und sind 50, 142 und 715 Nukleotide vom Startcodon entfernt. Weil die genomischen Fragmente der Plasmide mit den Nummern 2, 5, 7 und 11 (Abb.3.3) drei NruI Schnittstellen haben, enthalten diese Plasmide vermutlich das vollständige *srp2* Gen.

3.1.3 Das *srp2* Gen besteht aus 10 Exons und 9 Introns

Das 3,3 kb große Insert aus dem Plasmid mit der Nummer 2 (Abb.3.3) wurde in den Vektor pUC19 ligiert. Dazu wurden Restriktionsschnittstellen aus dem pUR19 Polylinker (BamHI und HindIII) verwendet. Das Insert wurde mit Primern sequenziert, die aus der cDNA Sequenz abgeleitet wurden. Um zu bestimmen ob das *srp2* Gen Introns enthält, wurde die genomische Sequenz mit der cDNA Sequenz verglichen.

Es wurden neun Introns gefunden, die das offene Leseraster des *srp2* Gens unterbrechen. Die Länge der Introns variiert von 40 – 190 bp. Die Struktur des *srp2* Gens ist in der Abb.3.4 wiedergegeben. Die Spleißstellen der Introns entsprechen weitgehend den aus *S.pombe* bekannten Konsensussequenzen (Prabhala *et al.*, 1992). Sie sind in der Tabelle 3.1 angegeben. Wie der Vergleich der Sequenzen zeigt, sind wie in den Introns der höheren Eukaryonten nur die ersten (GT) und letzten (AG) beiden Nukleotide der 5'- und 3'-Spleißstellen vollständig konserviert.

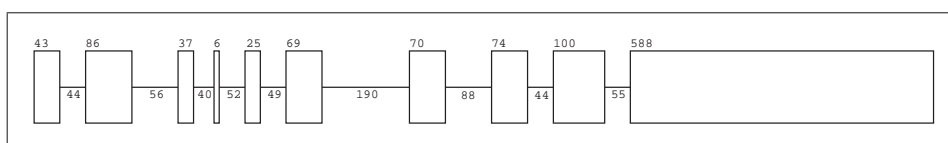


Abb. 3.4: Schematische Darstellung der Exon/Intron-Struktur des *srp2* Gens. Introns sind als Linien, Exons als Rechtecke gezeichnet. Die Länge der Introns und Exons ist in Basenpaaren angegeben. Das offene Leseraster des *srp2* Gens ist von 9 Introns unterbrochen und erstreckt sich über einen Bereich von 1.716 bp.

Tab. 3.1: Positionen und Sequenzen der Spleißstellen im *srp2* Gen aus *S.pombe*.

5'	Pos.	3'	Pos.	BP	Pos.	Abstand
ag/GTTGTA	399	TTAG/cgac	442	TTAAC	428	12
ag/GTAAAT	529	GTAG/gttg	554	CTAAC	571	11
tg/GTACGT	622	TTAG/actt	661	CTAAC	650	8
tc/GTATGC	668	AAAG/aggg	719	CTAAT	703	13
cg/GTAAGT	745	GAAG/tatt	793	CTAAT	781	9
aa/GTACGT	863	TCAG/atac	1052	CTAAC	1041	8
ag/GTAAGA	1123	ATAG/gacc	1210	TTAAC	1195	12
gg/GTAAGT	1285	GCAG/tgtt	1328	CTAAC	1314	11
ct/GTAAGC	1429	GCAG/gatg	1483	CTAAC	1470	10
/GTANGT		TAG/		CTAAY		

5', 5'-Spleißstelle; Pos., Position in der Sequenz; 3', 3'-Spleißstelle; BP, Branch Point; Abstand, Abstand der 3'-Spleißstelle zum BP. Die Konsensus-Sequenzen der Spleißstellen stehen in der letzten Zeile der Tabelle. Die Positionen sind in Basenpaaren angegeben und beziehen sich auf die genomische Sequenz von *srp2* (s. Anhang S.97).

3.2 Gene-Disruption von *srp2*

3.2.1 Herstellung eines Konstrukts für das Gene-Disruption

Um zu untersuchen, ob *srp2* ein essentielles Gen ist, wurde ein Gene-Disruption Experiment durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde ein Plasmid hergestellt, in dem das offene Leseraster des *srp2* Gens unterbrochen ist.

Dafür wurde aus dem *srp2* Gen ein 1,6 kb großes Fragment entfernt (Abb.3.5; A), indem das Plasmid mit dem 3,3 kb großen genomischen *srp2* Fragment mit den Enzymen NruI und Eco47III geschnitten wurde (s. Abb.3.3). In den verbleibenden Teil, der aus flankierenden Bereichen des *srp2* Gens und dem Vektor besteht, wurde das *LEU2*⁺ Gen von *Saccharomyces cerevisiae* ligiert (Abb.3.5; B).

Auf diese Weise wurden ca. 90 % des offenen Leserasters des *srp2* Gens deletiert. Weil sich die NruI Schnittstelle 93 bp stromabwärts vom Startcodon des *srp2* Gens befindet, können nur noch 14 der insgesamt 365 Aminosäuren von Srp2 translatiert werden.

Für die Integration dieses Konstrukts in das Genom von *S.pombe* müssen flankierende Sequenzen vorhanden sein, durch die eine homologe Rekombination erfolgen kann. Darum wurde für die Transformation in die *S.pombe* Zellen das gesamte 4,0 kb große Insert des Plasmids verwendet, das mit Hilfe der Restriktionsenzyme BamHI und PstI aus dem Vektor ausgeschnitten wurde.

3.2.2 Das *srp2* Gen ist für das mitotische Wachstum von *S.pombe* essentiell

Weil die Unterbrechung des *srp2* Gens für die *S.pombe* Zellen letal sein könnte, wurde ein diploider Stamm mit dem 4,0 kb großen BamHI/PstI Fragment transformiert.

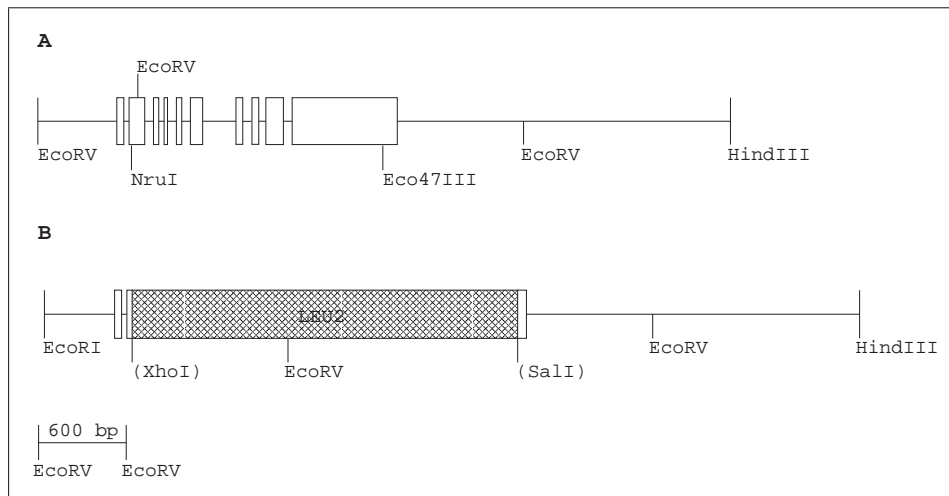


Abb. 3.5: Schema der Konstruktion für das Gene-Disruption von *srp2*. Aus dem *srp2* Gen wurde mit Hilfe der Enzyme *NruI* und *Eco47III* ein 1,6 kb großes Fragment entfernt (A) und durch ein 2,2 kb großes *XhoI/SalI* Fragment des *LEU2⁺* Gens aus *S.cerevisiae* ersetzt (B). Das 2,2 kb große *XhoI/SalI* *LEU2⁺* Fragment wurde aus dem Vektor pYEP13 (Rose & Broach, 1990) isoliert. Zur Ligation in den verbleibenden Teil von *srp2* wurden die *XhoI/SalI* Enden des *LEU2⁺* Fragments mit Hilfe einer Klenow-Polymerase Reaktion aufgefüllt. Für den Nachweis der Unterbrechung des *srp2* Gens mit Hilfe der Southern-Hybridisierung wurde ein 600 bp großes *EcoRV-EcoRV* Fragment als Sonde verwendet.

Der diploide Stamm hat den Genotyp $h^{+N/-S}$ *ade6-M210/ade6-M216* *leu1-32/leu1-32* *srp2⁺/srp2⁺* *ura4-D18/ura4-D18* und ist heterozygot für die Allele *ade6-M210* und *ade6-M216*.

Das *ade6* Gen von *S.pombe* kodiert für ein Enzym, das eine Funktion bei der Adenin-Synthese hat. In haploiden Zellen, die eine Mutation im *ade6* Gen besitzen, häuft sich ein Zwischenprodukt des Adenin-Stoffwechsels an, das die Zellen rot färbt. Deshalb bilden haploide Zellen, die das *ade6-M210* Allel enthalten, dunkelrot gefärbte Kolonien. Weil haploide Zellen mit dem *ade6-M216* Allel das Zwischenprodukt nicht so stark anhäufen, bilden sie rosa gefärbte Kolonien.

Dagegen wachsen diploide Zellen, die heterozygot für beide Allele sind, zu weißen Kolonien heran, denn zwischen den beiden Allelen findet eine intragene Komplementation statt. Auf diese Weise kann anhand der Koloniefärbung zwischen haploiden und diploiden Zellen unterschieden und die Segregation der beiden *ade6* Allele während der Meiose verfolgt werden.

Weiterhin enthält der diploide Stamm das *leu1-32* Allel, das mit dem *LEU2⁺* Gen von *S.cerevisiae* komplementiert werden kann. Die Zellen, in denen das *srp2* Gen durch das *LEU2⁺* Gen unterbrochen ist, sind deshalb Leucin prototroph. Nach der Transformation wurden die Zellen auf Minimalmedium mit Uracil ausplattiert und es wurde nach Leucin prototrophen Transformanten selektiert.

Aus den Transformanten wurde chromosomale DNA isoliert. Die DNA wurde mit dem Restriktionsenzym *EcoRV* geschnitten, in einem Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Mit Hilfe einer Southern-Hybridisierung wurde untersucht, ob das *srp2* Gen durch das *LEU2⁺* Gen unterbrochen ist (Abb.3.6; A). Als Hybridisierungs-sonde wurde ein 600 bp großes *EcoRV* Fragment des *srp2* Gens verwendet. Wenn das *srp2* Gen unterbrochen ist, erhält man ein 1.400 bp großes Fragment, weil das *LEU2⁺* Gen eine *EcoRV* Schnittstelle enthält (Abb.3.5; B). Das Wildtyp Allel von *srp2* liefert ein 600 bp großes Fragment.

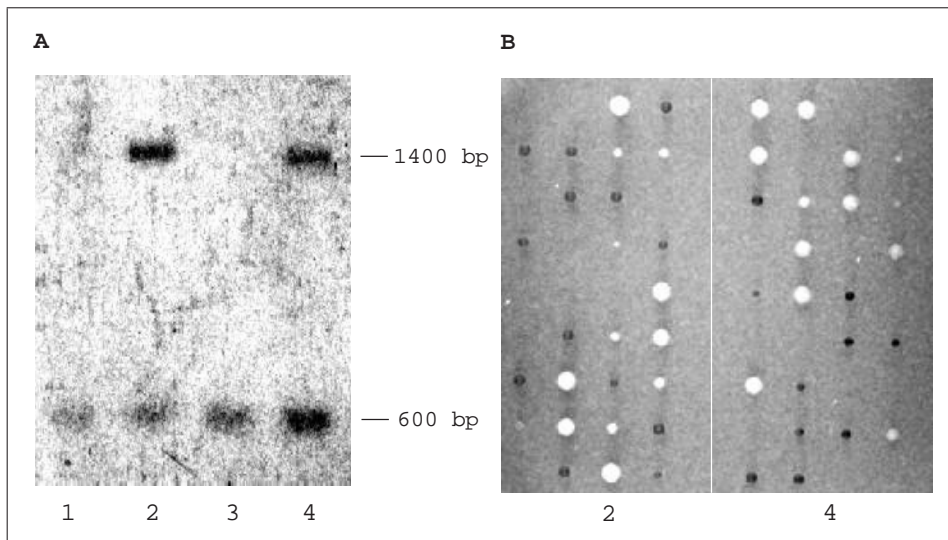


Abb. 3.6: Gene-Disruption von *srp2*. (A) Southern-Blot der Leucin prototrophen Transformanten. Aus den Transformanten wurde chromosomale DNA isoliert, auf Nylonmembran transferiert und mit einem 600 bp großen Fragment des *srp2* Gens hybridisiert. In den Spuren 1 und 3 ist DNA aus einem diploiden Wildtyp Stamm und in den Spuren 2 und 4 DNA aus einem diploiden Stamm mit unterbrochenem *srp2* Gen aufgetragen. (B) Tetradenanalyse der Leucin prototrophen Transformanten 2 und 4. Die hell und dunkel gefärbten Kolonien sind durch die Segregation der Allele *ade6-M210* und *ade6-M216* entstanden.

Von jeweils zwei Transformanten, in denen das *srp2* Gen unterbrochen war (Abb.3.6; A, 2 + 4), wurden Sporen aus mehreren Tetraden auf Vollmedium ausgelegt und für fünf Tage bei 30 °C inkubiert.

Das Ergebnis dieser Tetradenanalyse ist in der Abbildung 3.6 (B, 2 + 4) gezeigt: Von den meisten der ausgelegten Sporen einer Tetrade konnten jeweils nur zwei auskeimen und zu Kolonien heranwachsen. Das entspricht einer 2:2 Aufspaltung, die für ein essentielles Gen charakteristisch ist. Folglich ist das *srp2* Gen für das mitotische Wachstum von *S.pombe* essentiell.

Dennoch sind in manchen der ausgelegten Tetraden alle 4 Sporen ausgekeimt. Wurden diese Einsporklone auf Vollmedium ausgestrichen, so konnten davon jeweils nur zwei wachsen. Möglicherweise wird *Srp2* bei der Sporulation in den Sporen eingelagert, so daß die Zellen nach dem Auskeimen noch einige Teilungen durchführen können, bis der Vorrat an *Srp2* in den Zellen erschöpft ist.

3.3 *Srp2* ist ein Kernprotein

Die SR-Proteine sind am Spleißen von prä-mRNA beteiligt. Wie Untersuchungen an höheren Eukaryonten gezeigt haben, sind die SR-Proteine Kernproteine. Sie kommen sowohl im Karyoplasma, als auch in bestimmten subnukleären Strukturen vor, die man als „Nuclear Speckles“ bezeichnet. Die Nuclear Speckles dienen der Zelle vermutlich als Speicherorte für SR-Proteine und andere Spleißfaktoren. Weil *Srp2* große Ähnlichkeit mit den SR-Proteinen aus dem Menschen hat, wurde untersucht in welchem Kompartiment *Srp2* lokalisiert ist.

3.3.1 Fusion von Srp2 mit dem Green Fluorescent Protein

Das Green Fluorescent Protein (GFP) aus der Meeresqualle *Aequorea victoria* wird als Reporter gen verwendet, um den Aufenthaltsort von Proteinen in einer Zelle *in vivo* darzustellen. Das GFP besteht aus 238 Aminosäuren und enthält ein fluoreszierendes Chromophor, das durch die intramolekulare Zyklisierung von drei Aminosäuren (Ser⁶⁵-Tyr⁶⁶-Gly⁶⁷) entsteht. Wenn es von ultraviolettem Licht mit einer Wellenlänge von 400–470 nm angeregt wird, emittiert es grünes Licht einer Wellenlänge von 510 nm (Chalfie *et al.*, 1994).

Mit dem GFP markierte Proteine können in lebenden Zellen entweder durch direkte Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht oder in fixierten Zellen mit Hilfe eines Anti-GFP Antikörpers durch indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie dargestellt werden.

Durch die Fusion von Srp2 mit dem Green Fluorescent Protein und der Expression in *S.pombe* Zellen sollte untersucht werden, in welchem Kompartiment Srp2 lokalisiert ist.

Für die „in frame“ Fusion mit dem GFP mußte die *srp2* cDNA zunächst in einen Vektor mit einem dafür geeigneten Polylinker ligiert werden. Mit Hilfe einer PCR-Reaktion und Primern, die am Start- und Stopcodon der *srp2* cDNA binden, wurde der gesamte offene Leserahmen der cDNA amplifiziert (s. Material und Methoden S.32). Das PCR-Produkt wurde in den Vektor pUC19 ligiert und sequenziert, um es auf PCR-Fehler zu überprüfen. Anschließend wurde es in die BamHI Schnittstelle des Vektors pTG13 umkloniert (Abb.3.7).

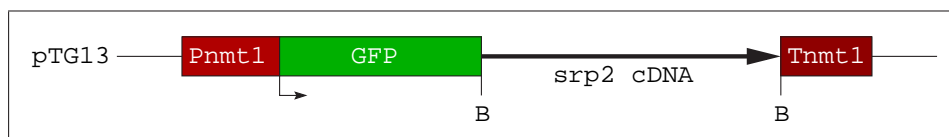


Abb. 3.7: Schematische Darstellung der Fusion der *srp2* cDNA mit dem Green Fluorescent Protein im Vektor pTG13. Die *srp2* cDNA ist an das carboxyterminale Ende des GFP fusioniert. Die Expression des Fusionsproteins erfolgt durch den *nmt1* Promotor. Die *srp2* cDNA wurde in die BamHI Schnittstelle (B) des Vektors ligiert. Die Transkription wird durch den *nmt1* Terminator beendet. Eine Restriktionskarte des Vektors pTG13 befindet sich auf S.16.

Mit Hilfe des Vektors pTG13 (Gross, 1997a) ist es möglich ein Protein „in frame“ mit dem carboxyterminalen Ende des Green Fluorescent Protein zu verbinden und in *S.pombe* Zellen zu exprimieren. Die Expression des GFP-Fusionsproteins erfolgt dabei durch den *nmt1* Promotor von *S.pombe*. Der *nmt1* Promotor (*nmt1*, no message with thiamine) wird durch die Thiaminkonzentration des Kulturmediums reguliert. In thiaminfreiem Medium ist der Promotor dereprimiert. In Medium das 2 μ M Thiamin enthält ist der Promotor reprimiert (Maundrell, 1989).

Nach dem Überführen in thiaminfreies Medium sinkt in den *S.pombe* Zellen die Thiaminkonzentration durch die Zellteilung. Dadurch wird der Promotor in einer exponentiell wachsenden Kultur nach ca. 12 Stunden vollständig dereprimiert, so daß die Expression des Fusionsproteins beginnt. Der pTG13 Vektor enthält außerdem das *ura4⁺* Gen von *S.pombe*, das als Markergen dient und die Integration des Vektors in das *S.pombe* Genom durch homologe Rekombination ermöglicht.

Die GFP-Srp2 Fusion wurde in den *S.pombe* Stamm SL11 integriert. Als Kontrolle wurde der Vektor pTG13 ohne cDNA Insert in den Stamm transformiert. Die Lokalisation des GFP wurde etwa 12 Stunden nachdem die *S.pombe* Zellen in thiaminfreies Medium überführt wurden mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz-Mikroskopie untersucht.

In den Zellen, die mit der GFP-Srp2 Fusion transformiert waren, fluoreszierte ausschließlich der Zellkern (Abb.3.8; Srp2). Das wurde durch die Färbung der Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI überprüft, der die DNA im Zellkern anfärbt. Folglich reichert sich das GFP-Srp2 Fusionsprotein im Zellkern an. Diese Anreicherung ist allein auf Srp2 zurückzuführen, weil in den Zellen, die nur mit dem pTG13 Vektor transformiert sind, das GFP in der gesamten Zelle verteilt ist (Abb.3.8; pTG13). Srp2 ist demnach ein Kernprotein.

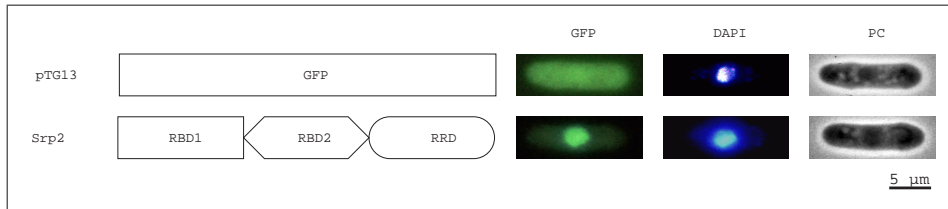


Abb. 3.8: Fusion von Srp2 mit dem Green Fluorescent Protein. Es bedeuten: Rechteck, erste RNA-Bindungsdomäne (RBD1); Sechseck, zweite RNA-Bindungsdomäne (RBD2); Oval, argininreiche Domäne (RRD). GFP: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Zellen. PC: Aufnahmen der Zellen im Phasenkontrast. DAPI: Färbung der DNA im Zellkern mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI. Die Zellen wurden mit Paraformaldehyd und Glutaraldehyd fixiert. Das GFP wurde in den Zellen durch indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie mit Hilfe eines polyklonalen Anti-GFP Antikörpers sichtbar gemacht. Der Balken entspricht einer Länge von etwa 5 µm.

3.3.2 Fusion der einzelnen Domänen von Srp2 mit dem GFP

Nach der Translation werden Kernproteine durch den Kernporenkomplex vom Cytoplasma in den Zellkern transportiert. Viele Proteine können nur dann in den Zellkern gelangen, wenn sie ein Kerntransportsignal (NLS, Nuclear Localization Sequences) besitzen.

Kerntransportsignale setzen sich in der Regel aus kurzen Sequenzen basischer Aminosäuren zusammen und befinden sich häufig am aminoterminalen Ende eines Proteins.

Wie die Untersuchungen an einigen SR-Proteinen aus dem Menschen ergeben haben, sind Teile der RS-Domäne und manchmal auch die RNA-Bindungsdomänen für den Transport der SR-Proteine in den Zellkern und die Nuclear Speckles erforderlich (Caceres *et al.*, 1997, Gama-Carvallho *et al.*, 1997, Hedley *et al.*, 1995). Allerdings ist in den SR-Proteinen keines der typischen Kerntransportsignale gefunden worden, wie z. B. ein NLS vom SV40- oder Nucleoplasmin-Typ (Dingwall, 1991, Dingwall & Laskey, 1991).

Bei der Untersuchung der Proteinsequenz von Srp2 wurde ebenfalls kein typisches NLS gefunden. Um zu bestimmen welcher Teil von Srp2 für den Transport in den Zellkern erforderlich ist, wurden die verschiedenen Domänen von Srp2 „in frame“ mit dem GFP fusioniert, in einen *S.pombe* Stamm transformiert und deren Lokalisation in den Zellen untersucht. Dafür wurden die RNA-Bindungsdomänen und die argininreiche Domäne von Srp2 mit Hilfe einer PCR-Reaktion isoliert und in den Vektor pTG13 ligiert (s. Material und Methoden S.32).

3.3.3 Die argininreiche Domäne von Srp2 enthält ein Kerntransportsignal

Nach der Transformation in den *S.pombe* Stamm SL11 wurde die Lokalisation der GFP-Fusionsproteine mit dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Wie die Abb.3.9 zeigt, sind die Fusionsproteine, welche die RNA-Bindungsdomänen enthalten, sowohl im Zellkern, als auch im Cytoplasma verteilt (RBD1-RBD2 und RBD1). Immer dann, wenn die carboxyterminale argininreiche Domäne vorhanden ist, sind die Fusionsproteine im Zellkern lokalisiert (Srp2, RBD1-RRD, RBD2-RRD und RRD).

Folglich ist die argininreiche Domäne von Srp2 für die Lokalisation im Zellkern notwendig und ausreichend. Sehr wahrscheinlich enthält diese Domäne das Kerntransportsignal von Srp2.

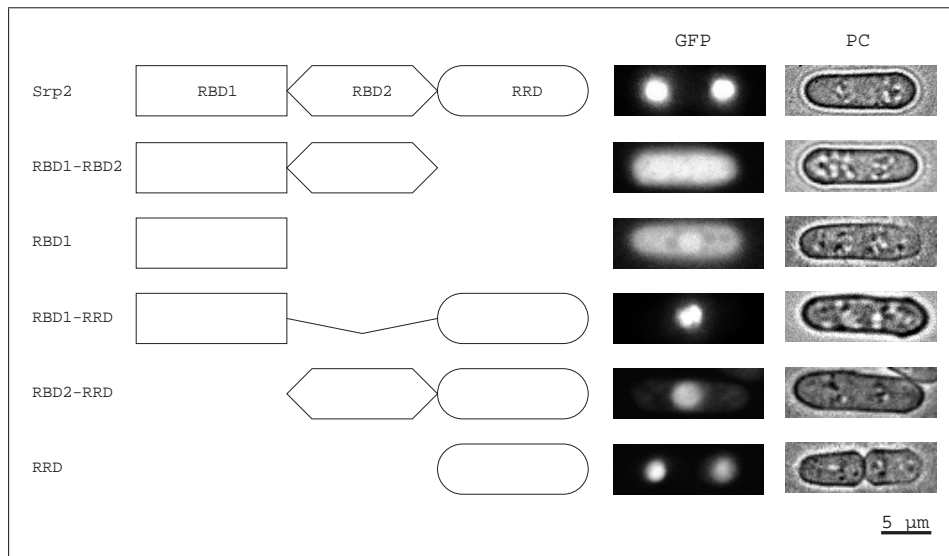


Abb. 3.9: Fusion der Domänen von *srp2* mit dem Green Fluorescent Protein. Es bedeuten: Rechteck, RBD1; Sechseck, RBD2; Oval, RRD. GFP: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Zellen. PC: Aufnahmen der Zellen im Phasenkontrast. Das GFP wurde in den Zellen durch direkte Auflicht-Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht. Der Balken entspricht einer Länge etwa 5 µm.

3.3.4 Die SR-Dipeptid Elemente der argininreichen Domäne haben die Funktion eines Kerntransportsignals

Wie die SR-Proteine aus dem Menschen enthält die carboxyterminale Domäne (RRD) von Srp2 keines der typischen Kerntransportsignale. Bei den Spleißfaktoren ASF/SF2 und SC35 aus dem Menschen sind Teile der RS-Domäne für den Transport in den Zellkern und die subnucleären Strukturen erforderlich.

Srp2 hat keine typische SR-Domäne, denn im Vergleich mit den SR-Proteinen aus dem Menschen sind nur wenige RS-Dipeptide vorhanden, die sich in den zwei kurzen SR-Elementen befinden, die am Beginn und am Ende der argininreichen Domäne liegen (Abb.3.2; SR1 und SR2). Um zu untersuchen, ob diese beiden SR-Elemente für den Transport von Srp2 in den Zellkern benötigt werden, wurden sie mit Hilfe einer gerichteten Mutagenese nach dem Verfahren von Kunkel *et al.* (1987) mutiert.

Für die Mutagenese wurde die *srp2* cDNA in den Vektor M13mp19 ligiert. Die Mutagenese wurde mit den in Tabelle 2.7 aufgeführten Oligonukleotiden durchgeführt (s. Material und Methoden S.34). In beiden Elementen wurden die Aminosäuren Serin gegen Alanin ausgetauscht. Dabei wurde die Sequenz des ersten SR-Elements, SRFRSRS, in die Sequenz ARFRARA (SR1*) und die Sequenz des zweiten SR-Elements, SRSPSP, in die Sequenz ARAPAP (SR2*) mutiert. Es wurde sowohl eine Einzelmutante, als auch eine Doppelmutante hergestellt, in der beide SR-Elemente mutiert sind (SR1*SR2*).

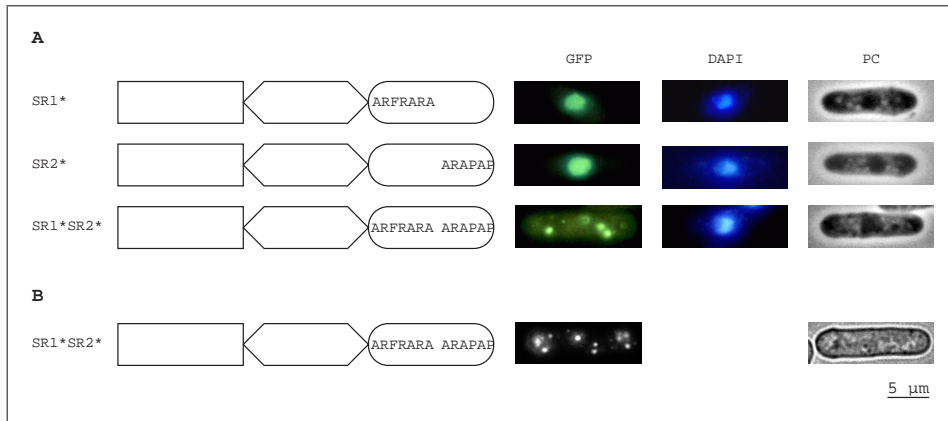


Abb. 3.10: Lokalisation von Srp2 nach der Mutagenese der SR-Dipeptid Elemente. Die mutierten cDNAs wurden mit dem GFP fusioniert. Die Lokalisation der Fusionsproteine wurde in fixierten Zellen durch (A) indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie und in lebenden Zellen durch (B) Auflicht-Fluoreszenzmikroskopie beobachtet. Es bedeuten: Rechteck, RBD1; Sechseck, RBD2; Oval, RRD. GFP: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Zellen. PC: Phasenkontrast. DAPI: Färbung der DNA im Zellkern mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI. Der Balken entspricht einer Länge von etwa 5 µm.

Die mutierten cDNAs wurden mit dem Green Fluorescent Protein fusioniert und in den *S.pombe* Stamm SL1 transformiert. Anschließend wurde die Lokalisation der Fusionsproteine mit dem Fluoreszenzmikroskop untersucht.

Wie die Abb.3.10 zeigt, haben die beiden Einzelmutationen (SR1* und SR2*) keinen Einfluß auf die Lokalisation der Fusionsproteine. Sie waren ausschließlich im Zellkern lokalisiert. Dagegen wird keine Kernlokalisation mehr beobachtet, wenn beide SR-Elemente mutiert sind (Abb.3.10-A; SR1*SR2*). In diesen Zellen häuft sich das Fusionsprotein im Cytoplasma an und ist dort unregelmäßig verteilt.

Wie die Färbung der Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI zeigt, ist der Kern dieser Zellen vollkommen intakt und befindet sich in der Mitte der Zelle. In diesem Bereich wird keine Fluoreszenz des GFP-Fusionsproteins beobachtet. Wie der Vergleich mit den lebenden Zellen zeigt (Abb.3.10-B; SR1*SR2*) ist die ungleichmäßige Verteilung des GFP nicht auf die Fixierung der Zellen zurückzuführen.

Folglich werden die beiden SR-Elemente der argininreichen Domäne für den Transport des Proteins in den Zellkern benötigt und haben eine Funktion als Kerntransportsignal. Weil Srp2 in den Zellkern gelangen kann, wenn nur eines der beiden SR-Elemente mutiert ist (SR1* und SR2*), ist es möglich, daß schon eine minimale Sequenz aus drei aufeinanderfolgenden SR-Dipeptiden als Kerntransportsignal wirken kann.

3.4 Überexpression des *srp2* Gens in *S.pombe*

Das *srp1* Gen von *S.pombe* kodiert für ein RNA-bindendes Protein, das aus einer RNA-Bindungs- und einer SR-Domäne besteht. Wenn die RNA-Bindungsdomäne von Srp1 in *S.pombe* Zellen überexprimiert wird, die das *srp1*⁺ Wildtyp Gen enthalten, dann akkumulieren die Zellen prä-mRNA und stellen das Wachstum ein.

Dieser dominant negative Phänotyp weist darauf hin, daß durch die Überexpression der RNA-Bindungsdomäne das Spleißen von prä-mRNA gehemmt wird. Dieser Phänotyp wird nicht beobachtet, wenn die Zellen das gesamte Srp1 Protein überexprimieren. Daraus wurde geschlossen, daß die RNA-Bindungsdomäne von Srp1 an der Erkennung und Bindung von prä-mRNA beteiligt sein könnte (Gross *et al.*, 1998).

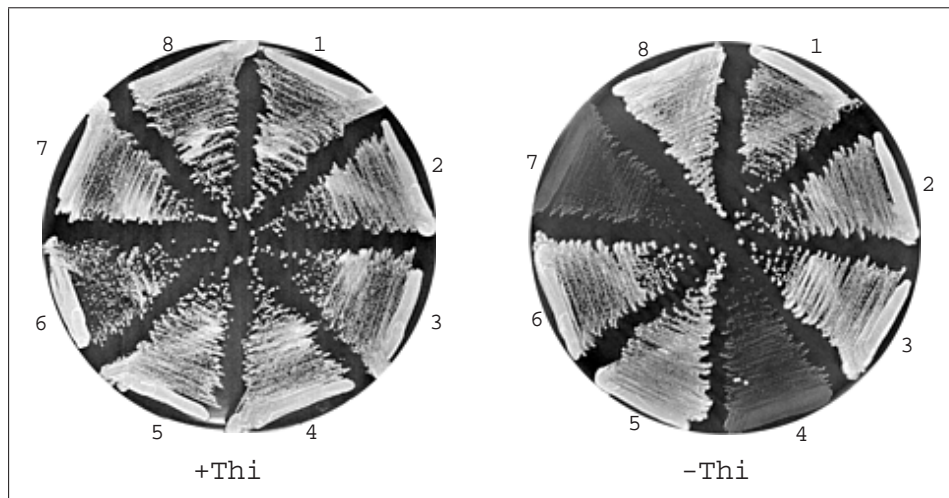


Abb. 3.11: Überexpression der Domänen von Srp2 und der mutierten cDNAs in *S.pombe*. Wachstum der Zellen nach 5 Tagen bei 30 ° C. Links: Medium mit Thiamin. Rechts: Medium ohne Thiamin. Es sind: 1, srp2 cDNA; 2, RBD1-RBD2; 3, RBD1; 4, RBD1-RRD; 5, RBD2-RRD, 6, RRD; 7, RBD2*, 8, pREP1-S* Vektor.

Der aminoterminal Teil von Srp2 besteht aus zwei RNA-Bindungsdomänen. Es sollte untersucht werden, ob die Überexpression der RNA-Bindungsdomänen in *S.pombe* einen ähnlichen Phänotyp hervorruft, wie die Überexpression der RNA-Bindungsdomäne von Srp1. Ein solcher Phänotyp würde auf eine Funktion von Srp2 beim prä-mRNA Spleißen hinweisen.

Für die Überexpression in *S.pombe* wurden die beiden RNA-Bindungsdomänen (RBD1-RBD2) und die erste RNA-Bindungsdomäne (RBD1) von Srp2 in den Expressionsvektor pREP1-S* ligiert. Der Vektor pREP1-S* enthält den *nmt1* Promotor und das *ars1* Element (*ars*, autonomously replicating sequence) von *S.pombe*. Dadurch liegt der Vektor in jeder Zelle in mehreren Kopien vor, wodurch die Expression von Srp2 zusätzlich verstärkt wird.

Die Plasmide wurden in den *S.pombe* Stamm SL1 transformiert. Das Wachstum der Transformanten wurde auf Medium mit und ohne Thiamin getestet. Wie die Abb.3.11 zeigt, wirkt sich die Überexpression der RNA-Bindungsdomänen nicht auf das Wachstum der Zellen aus. Es ist mit dem Wachstum der Zellen vergleichbar, die nur mit dem Vektor oder der *srp2* cDNA transformiert sind (Abb.3.11; 1, 2, 3, 5, 6 und 8).

Wie die Fusion mit dem Green Fluorescent Protein gezeigt hat, sind die RNA-Bindungsdomänen von Srp2 im Zellkern und im Cytoplasma der *S.pombe* Zellen lokalisiert. Der Transport in den Zellkern ist von der argininreichen Domäne von Srp2 abhängig (Abb.3.9; RRD).

Im Gegensatz dazu ist die RNA-Bindungsdomäne von Srp1 ausschließlich im Zellkern lokalisiert. Für den Transport in den Zellkern ist der carboxyterminale Teil von Srp1 nicht erforderlich. Dies wurde von Gross *et al.* (1998) durch die Fusion mit dem Green Fluorescent Protein gezeigt. Da die RNA-Bindungsdomänen von Srp2 sowohl im Cytoplasma, als auch im Zellkern lokalisiert sind, wäre es möglich, daß deren Konzentration im Zellkern zu gering ist, um das Wachstum der Zellen zu hemmen.

Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurde die erste und die zweite RNA-Bindungsdomäne von Srp2 mit der argininreichen Domäne fusioniert (RBD1-RRD, RBD2-RRD) und in den Vektor pREP1-S* ligiert. Die Plasmide wurden in den *S.pombe* Stamm SL1 transformiert und das Wachstum der Transformanten auf Medium mit und ohne Thiamin getestet.

Wie die Abb.3.11 zeigt, wird das Wachstum der Zellen gehemmt, wenn das Konstrukt überexprimiert wird, das aus der ersten RNA-Bindungsdomäne und der carboxyterminalen Domäne zusammengesetzt ist (Abb.3.11-4, RBD1-RRD). Dagegen wirkt sich die Überex-

pression der zweiten RNA-Bindungsdomäne und der argininreichen Domäne (Abb.3.11-5, RBD2-RRD), sowie der argininreichen Domäne (Abb.3.11-6, RRD) nicht auf das Wachstum der Zellen aus.

Demnach führt die Überexpression der ersten RNA-Bindungsdomäne von Srp2 zu einem ähnlichen Phänotyp, wie die Überexpression der RNA-Bindungsdomäne von Srp1. Folglich könnten die RNA-Bindungsdomänen von Srp1 und Srp2 eine ähnliche Funktion haben. Das Wachstum der Zellen wird nur dann gehemmt, wenn die erste RNA-Bindungsdomäne von Srp2 genügend hoher Konzentration in den Zellkern gelangen kann. Diese Beobachtung zeigt, daß Srp2 eine Funktion im Zellkern ausübt.

In dem Konstrukt RBD1-RRD ist die zweite RNA-Bindungsdomäne vollständig deletiert. Die Hemmung des Wachstums der *S.pombe* Zellen ist offenbar auf den Verlust der Funktion dieser Domäne zurückzuführen, denn die Überexpression der gesamten *srp2* cDNA wirkt sich nicht auf das Wachstum der Zellen aus. Wenn diese Annahme richtig ist, dann könnte eine Mutation in der zweiten RNA-Bindungsdomäne von Srp2, welche die Funktion dieser Domäne zerstört, einen ähnlichen Phänotyp hervorrufen. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurde die *srp2* cDNA mit Hilfe einer gerichteten Mutagenese verändert:

In der zweiten RNA-Bindungsdomäne ist die Signatursequenz SWQDLKD am besten konserviert (s. Abb.3.1, S.39). Dieses Sequenzmotiv ist absolut invariabel und in allen SR-Proteinen mit zwei RNA-Bindungsdomänen enthalten.

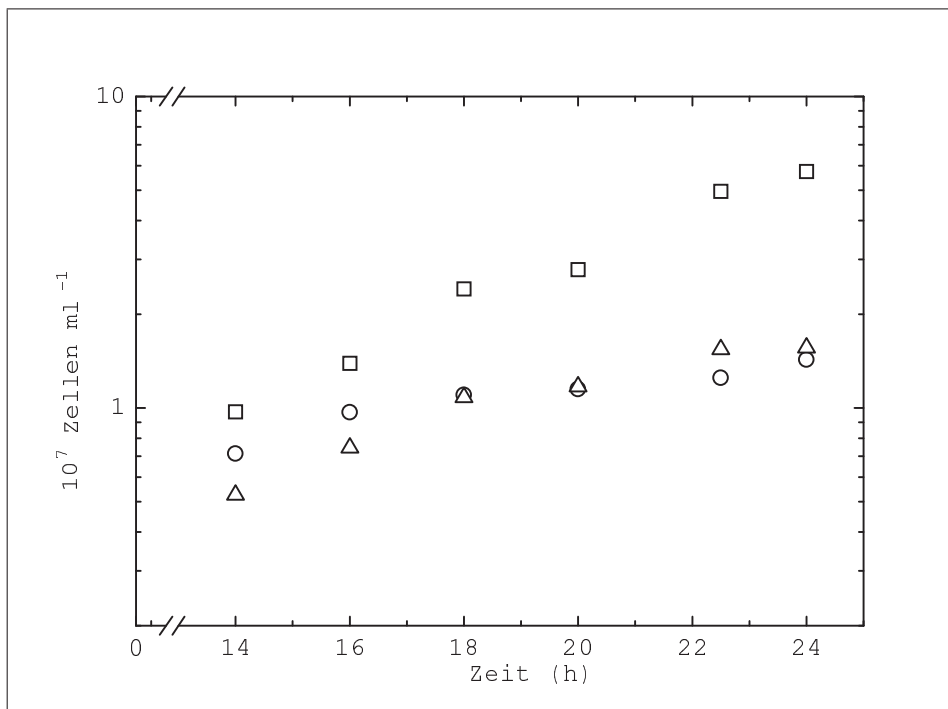


Abb. 3.12: Vergleich des Wachstumsverhaltens von *S.pombe* Zellen, die das Konstrukt RBD1-RRD (○), die *srp2* cDNA (□) und die in der zweiten RNA-Bindungsdomäne mutierte *srp2* cDNA überexprimieren (△). Die Kulturen wurden mit einer Zellzahl von $5 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ in Medium ohne Thiamin angeimpft und bei 30°C kultiviert. Das Wachstum der Zellen wurde über einen Zeitraum von 14 – 24 h nach dem Animpfen verfolgt.

Die starke Konservierung dieser Sequenz deutet darauf hin, daß dieses Motiv für die Funktion der SR-Proteine essentiell sein könnte. Eine Mutation in dieser Sequenz könnte daher zum Verlust der Funktion der zweiten RNA-Bindungsdomäne oder des gesamten Proteins führen.

Damit die Sekundärstruktur des Proteins möglichst unverändert bleibt, wurde die Signatursequenz SWQDLKD bei der Mutagenese durch Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften ersetzt (ALQNVRN). Die mutierte cDNA wurde in den Vektor pREP1-S* ligiert und in den *S.pombe* Stamm SL1 transformiert.

Anschließend wurde das Wachstum der Transformanten mit dem Wachstum von Zellen verglichen, welche die *srp2* cDNA und das Konstrukt überexprimieren, das aus der ersten RNA-Bindungsdomäne und der argininreichen Domäne (RBD1-RRD) zusammengesetzt ist (Abb.3.11; 1, 7 und 4).

Des weiteren wurden die *S.pombe* Zellen in Minimalmedium ohne Thiamin kultiviert und das Wachstum durch die Bestimmung der Zellzahl über mehrere Stunden verfolgt. Das Ergebnis dieses Versuchs zeigt die Wachstumskurve in der Abb.3.12.

Wie am Verlauf der Wachstumskurven zu erkennen ist, verhalten sich die Zellen bei der Überexpression der mutierten *srp2* cDNA und des Konstrukts RBD1-RRD sehr ähnlich. Beide Stämme stellen das Wachstum nach etwa 16 Stunden mit einer Zellzahl von ca. $5 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ ein. Dagegen zeigen die Zellen, welche die *srp2* cDNA überexprimieren normales Wachstum. Sie erreichen nach 24 Stunden mit einer Zellzahl von ca. $8 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$ die stationäre Phase.

Folglich wird die Hemmung des Wachstums der *S.pombe* Zellen durch den Verlust der Funktion der zweiten RNA-Bindungsdomäne von Srp2 verursacht.

3.4.1 Die Überexpression der ersten RNA-Bindungsdomäne von Srp2 führt nicht zur Akkumulation von prä-mRNA

Wenn die RNA-Bindungsdomäne von Srp1 in *S.pombe* Zellen überexprimiert wird, führt dies zur Akkumulation von prä-mRNA (Gross *et al.*, 1998). Die Akkumulation der prä-mRNA korreliert mit der Hemmung des Wachstums der *S.pombe* Zellen. Deshalb wurde am Beispiel des *tflld* Gens von *S.pombe* untersucht, ob es bei der Überexpression der einzelnen Domänen von Srp2 ebenfalls zu einer Akkumulation von prä-mRNA kommt.

Das *tflld* Gen von *S.pombe* kodiert für das TATA-binding Protein (Tbp). Es hat eine Länge von 1.072 bp und wird in *S.pombe* konstitutiv expriert (Hoffmann *et al.*, 1990). Weil das *tflld* Gen drei Introns enthält, die eine Länge von insgesamt 380 bp besitzen, ist es sehr einfach die *tflld* prä-mRNA von der *tflld* mRNA mit Hilfe einer Northern-Hybridisierung zu unterscheiden.

Für die Northern-Hybridisierung wurde aus den *S.pombe* Zellen Gesamt-RNA isoliert, welche die einzelnen Domänen von Srp2 überexprimieren. Zusätzlich wurde Gesamt-RNA aus einem *S.pombe* Stamm isoliert (SL1), der das temperatursensitive Allel *prp4-73^{ts}* des *prp4* Gens besitzt. Dieser Stamm stellt bei der restriktiven Temperatur von 36 °C das Wachstum ein und akkumuliert prä-mRNA. Bei der permissiven Temperatur von 26 °C wächst er wie ein Wildtyp Stamm. Die aus diesem Stamm bei 26 und 36 °C isolierte Gesamt-RNA wurde als Kontrolle verwendet.

Die RNA-Proben wurden in einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit der *tflld* cDNA hybridisiert. Wie das Autoradiogramm in der Abb.3.13 zeigt, führt das temperatursensitive *prp4-73^{ts}* Allel bei der restriktiven Temperatur von 36 °C zu einer deutlichen Akkumulation von prä-mRNA. In diesen Zellen ist nahezu keine mRNA mehr nachweisbar.

Dagegen wird bei der Überexpression von Srp2 keine Akkumulation von *tflld* prä-mRNA beobachtet. Selbst die Überexpression des Konstrukts, das aus der ersten RNA-Bindungsdomäne und der argininreichen Domäne von Srp2 besteht (RBD1-RRD) und das Wachstum der Zellen bei der Überexpression hemmt, führt nicht zur Akkumulation von prä-mRNA. In diesen Zellen hat sich das Verhältnis zwischen der mRNA und der prä-mRNA Bande nicht signifikant verändert.

Die Überexpression der einzelnen Domänen von Srp2 wirkt sich demnach nicht auf das Spleißen der *tflld* prä-mRNA aus. Weil die Akkumulation von prä-mRNA nur am Beispiel des *tflld* Gens untersucht wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, daß es durch

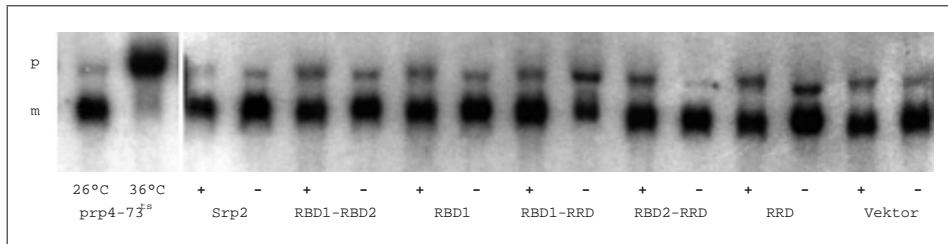


Abb. 3.13: Northern-Hybridisierung der Gesamt-RNA aus *S.pombe* Zellen, welche die einzelnen Domänen von Srp2 überexprimieren. Die Gesamt-RNA wurde nach 16 Stunden Wachstum aus den Zellen isoliert. Die Zellen wurden in Minimalmedium mit und ohne Thiamin bei einer Temperatur von 30 ° C kultiviert. Es bedeuten: p = prä-mRNA, m = mRNA; + = mit Thiamin, - = ohne Thiamin. Als Kontrolle diente Gesamt-RNA, die aus einem *S.pombe* Stamm mit dem temperatursensitiven Allel *prp4-73^{ts}* bei 26 und 36 ° C isoliert wurde. Als Hybridisierungssonde wurde die *tfld* cDNA verwendet.

die Überexpression zu einer Akkumulation von anderen prä-mRNAs kommt als bei der Überexpression von Srp1. Möglicherweise binden Srp1 und Srp2 an unterschiedliche prä-mRNAs.

Da bei der Überexpression der RNA-Bindungsdomäne von Srp1 *tfld* prä-mRNA akkumuliert wird, wurde die erste RNA-Bindungsdomäne von Srp2 gegen die RNA-Bindungsdomäne von Srp1 ausgetauscht und getestet, wie sich die Überexpression dieses Fusionsproteins auf das Wachstum und das Spleißen von *tfld* prä-mRNA auswirkt.

3.4.2 Die zweite RNA-Bindungsdomäne von Srp2 verändert die Funktion der RNA-Bindungsdomäne von Srp1

Für den Austausch der RNA-Bindungsdomänen wurden die Aminosäuresequenzen von Srp1 und Srp2 zunächst miteinander verglichen. Dadurch sollte der Bereich von Srp2 festgelegt werden, der durch die RNA-Bindungsdomäne von Srp1 ersetzt wird.

Wie die Abb.3.14 zeigt, haben die beiden RNA-Bindungsdomänen von Srp1 und Srp2 52 % ähnliche und 29 % identische Aminosäuren. Weiterhin zeigt der Vergleich, daß die Signatursequenzen sowie das RNP-1 und RNP-2 Motiv gut miteinander übereinstimmen. Allerdings unterscheidet sich Srp1 von Srp2 am Ende der RNA-Bindungsdomäne durch eine kurze glycinreiche Region, die charakteristisch für SR-Proteine mit nur einer RNA-Bindungsdomäne ist (Birney *et al.*, 1993).

Für den Austausch der RNA-Bindungsdomäne wurde die aminoterminal Region von Srp1 mit Hilfe einer PCR-Reaktion isoliert. Wenn diese Region, die für die ersten 120 Aminosäuren von Srp1 kodiert, in *S.pombe* überproduziert wird, dann führt dies zu einer Akkumulation von *tfld* Transkripten und zur Hemmung des Wachstums der Zellen (Gross *et al.*, 1998). Dieser Teil von Srp1 wurde mit dem carboxyterminalen Teil von Srp2 fusioniert, der aus der zweiten RNA-Bindungsdomäne und der argininreichen Domäne besteht (Aminosäuren 90–365, RBD_{Srp1}RBD2_{Srp2}RRD_{Srp2}). Zusätzlich wurde die RNA-Bindungsdomäne von Srp1 mit der argininreichen Domäne von Srp2 fusioniert (Aminosäuren 170–365, RBD_{Srp1}RRD_{Srp2}). Diese Fusionskonstrukte sind in der Abb.3.15-A abgebildet.

Die Konstrukte wurden in den Vektor pREP1-S* ligiert und in den *S.pombe* Stamm AG8 transformiert. Anschließend wurde getestet, wie sich die Überexpression dieser Fusionsproteine auf das Wachstum der Zellen auswirkt. Dazu wurden die Transformanten auf Minimalmedium mit und ohne Thiamin ausgestrichen.

Wie bereits zuvor beobachtet wurde, hemmt die Überexpression der RNA-Bindungsdomäne von Srp1 das Wachstum der Zellen. Das Wachstum wird auch dann gehemmt, wenn die *S.pombe* Zellen das Konstrukt RBD_{Srp1}RRD_{Srp2} überexprimieren (Abb.3.15-A).



Wenn aber die RNA-Bindungsdomäne von Srp1 mit der zweiten RNA-Bindungsdomäne und der argininreichen Domäne fusioniert ist (RBD_{Srp1}RBD2-RRD_{Srp2}), dann wird keine Hemmung des Wachstums mehr beobachtet (Abb.3.15-A: -Thi).

Folglich kann die zweite RNA-Bindungsdomäne von Srp2 den dominant negativen Effekt aufheben, den die RNA-Bindungsdomäne von Srp1 bei der Überexpression auf das Wachstum der Zellen ausübt.

Mit Hilfe einer Northern-Hybridisierung wurde untersucht, wie sich die Überexpression der Konstrukte auf das prä-mRNA Spleißen auswirkt. Dazu wurde aus den *S.pombe* Zellen Gesamt-RNA isoliert. Nach dem Transfer auf eine Nylonmembran wurde die Gesamt-RNA mit der *tfIIId* cDNA hybridisiert.

Die Abb.3.15-B zeigt das Autoradiogramm dieser Northern-Hybridisierung. Wie schon von Gross *et al.* (1998) beobachtet wurde, führt das Überexprimieren der RNA-Bindungsdomäne von Srp1 zur Akkumulation von *tfIIId* prä-mRNA. Auch wenn das Konstrukt RBD_{Srp1}RRD_{Srp2} überexprimiert wird, akkumulieren die Zellen prä-mRNA, allerdings nicht so stark, wie bei der Überexpression der RNA-Bindungsdomäne von Srp1. Dies könnte durch die Lokalisation des Fusionsproteins bedingt sein, denn die argininreiche Domäne (RRD) bestimmt über den Transport von Srp2 in den Zellkern.

Die *S.pombe* Zellen akkumulieren keine prä-mRNA, wenn sie das Konstrukt RBD_{Srp1}RBD2-RRD_{Srp2} überproduzieren. In diesen Zellen ist das Verhältnis zwischen der prä-mRNA und mRNA mit der Kontrolle vergleichbar (Abb.3.15-B; 26 ° C).

Demnach wird durch die Fusion der RNA-Bindungsdomäne von Srp1 mit der zweiten RNA-Bindungsdomäne und der argininreichen Domäne von Srp2 nicht nur der dominant negative Effekt auf das Wachstum der Zellen aufgehoben, sondern auch die Akkumulation der *tfIIId* prä-mRNA. Das bedeutet, daß sich die Funktion der RNA-Bindungsdomäne von Srp1 durch die Fusion mit der zweiten RNA-Bindungsdomäne von Srp2 verändert hat. Dies könnte verschiedene Ursachen haben:

Zum Beispiel wäre es möglich, daß sich die RNA-Bindungsspezifität dieser Domäne oder des gesamten Proteins durch die Fusion geändert hat, so daß das Spleißen der *tfIIId* prä-mRNA nicht mehr beeinträchtigt wird, weil das Fusionsprotein nicht mehr an die *tfIIId* prä-mRNA binden kann. Es besteht die Möglichkeit, daß die RNA-Bindungsdomäne von Srp1 die Funktion der ersten RNA-Bindungsdomäne von Srp2 ersetzen kann, denn bei der Überexpression der Srp2 cDNA wurde ebenfalls keine Akkumulation von *tfIIId* prä-mRNA beobachtet (Abb.3.13).

Diese Möglichkeit, wurde *in vivo* mit Hilfe eines Komplementierungstests untersucht (s. S.65). Für die Durchführung dieses Tests wurde ein *S.pombe* Stamm benötigt, der die konditionale Expression des *srp2* Gens erlaubt. Die Herstellung dieses Stamms ist im folgenden Abschnitt beschrieben.

3.5 Herstellung eines konditional letalen *srp2* Stamms

Bisher wurde die Funktion von *srp2* nur in solchen *S.pombe* Stämmen untersucht, die das *srp2*⁺ Wildtyp-Gen enthalten. Deshalb wurde ein Stamm hergestellt, der die konditionale Expression des *srp2* Gens erlaubt und es ermöglicht, die Auswirkung von Mutationen im *srp2* Gen auf das Wachstum der *S.pombe* Zellen mit Hilfe von Komplementierungstests zu untersuchen.

Für die Herstellung dieses Stamms wurde die *srp2* cDNA mit dem *nmt1-8* Promotor von *S.pombe* fusioniert. Dieser Promotor hat eine Mutation in der TATA-Box, wodurch die Stärke dieses Promotors gegenüber dem Wildtyp *nmt1* Promotor reduziert ist (Basi *et al.*, 1993).

Der *nmt1-8* Promotor wird durch die Zugabe von 2 µM Thiamin in das Kulturmedium vollständig reprimiert. Dagegen hat der Wildtyp Promotor unter diesen Bedingungen noch basale Transkriptionsaktivität (Maundrell, 1993).

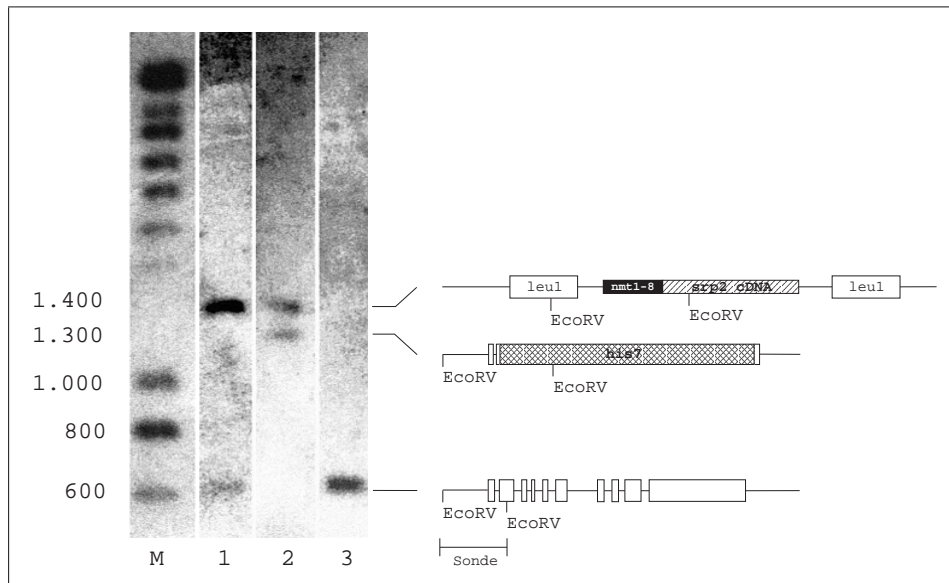


Abb. 3.16: Kontrolle der Integration der *srp2* cDNA in das *leu1* Gen und der Gene-Disruption von *srp2* mit dem *his7*⁺ Gen durch eine Southern-Hybridisierung. Aus den *S.pombe* Transformanten, die mit (1), der *srp2* cDNA, sowie (2), der *srp2* cDNA und dem Gene-Disruption Konstrukt transformiert waren, wurde chromosomale DNA isoliert. Als Kontrolle wurde chromosomale DNA aus dem nicht-transformierten *S.pombe* Stamm (SL97) verwendet (3). Die DNA wurde mit dem Restriktionsenzym *EcoRV* geschnitten und mit einem 600 bp großen *EcoRV* Fragment aus dem *srp2*⁺ Gen hybridisiert. Wenn die *srp2* cDNA in das *leu1* Gen integriert ist, dann entsteht ein 1.400 bp großes Fragment, das mit der Sonde hybridisiert (Spuren 1 und 2). Wenn das *srp2*⁺ Gen mit dem *his7*⁺ Gen unterbrochen ist, erhält man ein 1.300 bp großes Fragment (Spur 2). Das *srp2*⁺ Wildtyp-Gen liefert ein 600 bp großes Fragment, das der Sonde entspricht (Spuren 1 und 3).

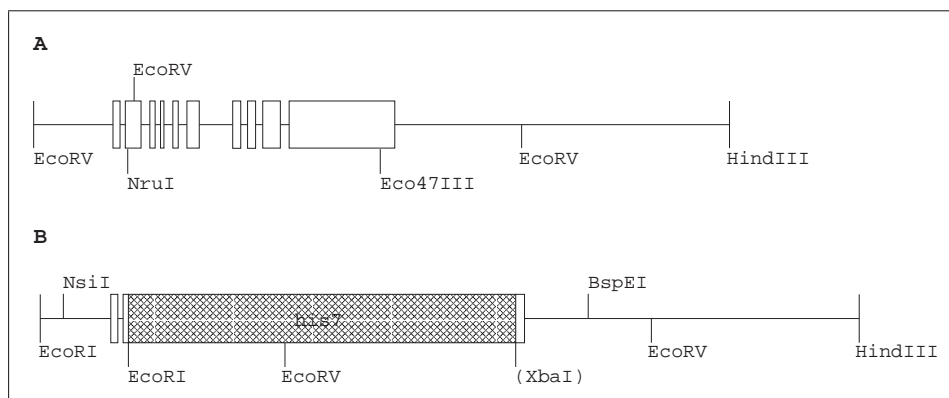


Abb. 3.17: Schema des Konstrukts für die Unterbrechung des *srp2* Gens mit dem *his7*⁺ Gen. (A) Aus dem *srp2* Gen wurde mit Hilfe der Enzyme *NruI* und *Eco47III* ein 1,6 kb großes Fragment entfernt und durch ein 2,1 kb großes *EcoRI/XbaI* Fragment des *his7* Gens ersetzt, das aus dem Vektor pEA2 isoliert wurde (Apolinario *et al.*, 1993). (B) Für die Ligation in das *srp2*⁺ Gen wurden die *EcoRI/XbaI* Enden des *his7*⁺ Fragments mit Hilfe einer Klenow-Polymerasereaktion aufgefüllt. Für die Transformation in *S.pombe* wurde ein 2.400 bp großes *NsiI/BspEI* Fragment aus dem Konstrukt ausgeschnitten. Das Konstrukt wurde im Vektor pUC19 hergestellt. Für den Nachweis der Gene-Disruption mit Hilfe einer Southern-Hybridisierung wurde ein 600 bp großes *EcoRV-EcoRV* Fragment des *srp2*⁺ Gens verwendet (s. Abb.3.16).

Zum Beispiel lieferte das mit dem *nmt1* Promotor fusionierte *lacZ* Gen von *E.coli* in Gegenwart von Thiamin eine β -Galaktosidase-Aktivität von $24,7 \pm 9$ Units, wenn es auf einem Plasmid in den *S.pombe* Zellen vorlag. Wenn das *lacZ* Gen mit dem *nmt1-8* Promotor fusioniert war, dann wurden unter den gleichen Bedingungen nur noch $1,2 \pm 0,3$ Units gemessen (Forsburg, 1993).

Um die Expression von Srp2 in den *S.pombe* Zellen noch weiter zu reduzieren, wurde die *srp2* cDNA in das *leu1* Gen integriert, damit sie in nur einer Kopie pro Zelle vorliegt. Dafür wurde die cDNA zusammen mit dem *nmt1-8* Promotor in den Vektor pJK148 (Keeney & Boeke, 1994) ligiert und in einen *S.pombe* Stamm mit dem Genotyp h^{-S} *his7-366* *leu1-32* *ura4-D18* *srp2*⁺ (SL97) transformiert.

Die Integration in den *leu1* Locus wurde mit Hilfe einer Southern-Hybridisierung überprüft. Als Hybridisierungssonde wurde ein 600 bp großes EcoRV Fragment aus dem *srp2* Gen verwendet. Weil dieses Fragment sowohl 5'-flankierende Sequenzen als auch die Exons 1 und 2 des *srp2* Gens enthält, lässt sich damit sowohl das *srp2* Gen als auch die *srp2* cDNA nachweisen. Wie die Abb.3.16 zeigt, wurde die *srp2* cDNA korrekt in den *leu1* Locus integriert.

Damit die Expression von Srp2 ausschließlich durch den *nmt1-8* Promotor reguliert werden kann, wurde in diesem Stamm das *srp2*⁺ Wildtyp-Gen durch ein Gene-Disruption unterbrochen. Dazu wurde ein Plasmid hergestellt, in dem das *srp2*⁺ Gen durch das *his7*⁺ Gen von *S.pombe* unterbrochen ist: Aus einem 3,3 kb großen genomischen *srp2* Fragment (Abb.3.17-A) wurde ein 1,5 kb großes Fragment, das ca. 90 % des offenen Leserasters von *srp2* enthält, mit Hilfe der Enzyme NruI und Eco47III entfernt. In den verbleibenden Teil von *srp2* wurde ein 2,1 kb großes EcoRI/XbaI Fragment des *his7*⁺ Gen von *S.pombe* ligiert.

Für die Integration dieses Konstrukts in den *srp2* Locus müssen flankierende Bereiche vorhanden sein, die eine homologe Rekombination ermöglichen. Deshalb wurde der Stamm mit einem 2.400 bp großen Fragment transformiert, das mit Hilfe der Restriktionsenzyme NsiI und BspEI aus dem Konstrukt isoliert wurde.

Nach der Transformation wurde auf Histidin prototrophe Transformanten selektiert. Anschließend wurde nach solchen Transformanten gesucht, die in Gegenwart von Thiamin nicht mehr wachsen können. Dazu wurden die Transformanten auf Minimalmedium mit Thiamin gestempelt.

Wenn in den Transformanten das *srp2*⁺ Gen mit dem *his7*⁺ Gen unterbrochen ist, wird die Expression von *srp2* ausschließlich durch den *nmt1-8* Promotor reguliert. Weil das *srp2* Gen für das mitotische Wachstum von *S.pombe* essentiell ist, wachsen diese Transformanten nur noch auf thiaminfreiem Medium (Abb.3.18).

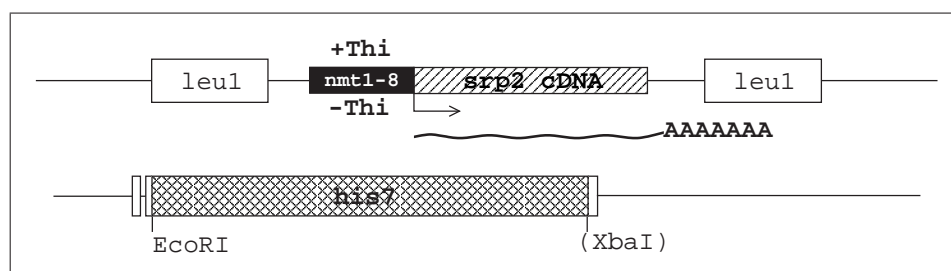


Abb. 3.18: Schema des konditional letalen *srp2* Stamms. Der Stamm hat den Genotyp h^{-S} *his7-366* *leu1-32* *int::pJK148-srp2* *ura4-D18* *srp2::his7*. Die *srp2* cDNA ist mit dem *nmt1-8* Promotor fusioniert und in den *leu1* Locus integriert. Der Pfeil symbolisiert die Transkription von *srp2*, die durch Thiamin (+Thi) reprimiert wird. Unten ist das *srp2* Gen dargestellt, das mit dem *his7*⁺ Gen unterbrochen ist. Weil das *srp2*⁺ Gen für das mitotische Wachstum von *S.pombe* essentiell ist, wächst dieser Stamm nur noch auf thiaminfreiem Medium. Da der Stamm das *ura4-D18* Allel enthält, ist er auxotroph für Uracil.

Um die Unterbrechung von *srp2*⁺ mit dem *his7*⁺ Gen zu überprüfen, wurde aus den Transformanten, die nur noch auf thiaminfreiem Medium wachsen konnten, chromosomale DNA isoliert und eine Southern-Hybridisierung durchgeführt. Wie das Autoradiogramm in der Abb.3.16 (Spur 2) zeigt, wurde das *his7*⁺ Gen korrekt in das *srp2*⁺ Gen integriert. Folglich hat dieser Stamm den Genotyp *h*^{-S} *his7*-366 *leu1*-32 *int::pJK148-srp2 ura4*-D18 *srp2::his7*.

Nun wurde überprüft, ob der konditional letale Phänotyp dieses Stamms durch das *srp2*⁺ Gen komplementiert werden kann. Dazu wurden drei Plasmide, die bei der Koloniehybridisierung aus der genomischen *S.pombe* Bank isoliert wurden (s. S.42, Abb.3.3; Nr. 2, 11 und 7) und unterschiedlich große Fragmente des *srp2*⁺ Gens enthalten, in den Stamm transformiert. Als Kontrolle diente der Vektor pUR19 ohne Insertion.

Weil der Vektor pUR19 das *ura4*⁺ Gen von *S.pombe* als Selektionsmarker enthält, wurde nach der Transformation auf Uracil prototrophe Transformanten selektiert. Anschließend wurde das Wachstum der Transformanten auf Minimalmedium mit und ohne Thiamin getestet.

Wie die Abb.3.19 zeigt, wurde der Stamm von den 3,5 und 3,3 kb großen genomischen *srp2* Fragmenten komplementiert (Abb.3.19, Nr. 2 und 11), jedoch nicht von dem 2,1 kb großen Fragment und dem pUR19 Vektor ohne Insertion.

Folglich wird der konditional letale Phänotyp durch die Repression der Expression von *Srp2* verursacht. Darüber hinaus zeigt dieses Experiment, daß die 3,3 und 3,5 kb großen genomischen Fragmente ein funktionelles *srp2* Gen enthalten, einschließlich des *srp2* Promotors.

Mit dem 2,1 kb großen genomischen Fragment kann der konditional letale Phänotyp nicht komplementiert werden, weil es wahrscheinlich nicht den vollständigen *srp2* Promotor enthält, da es nur einen sehr kleinen Teil der 5'-flankierenden Region des *srp2* Gens besitzt (s. S.42, Abb.3.3; Nr. 7).

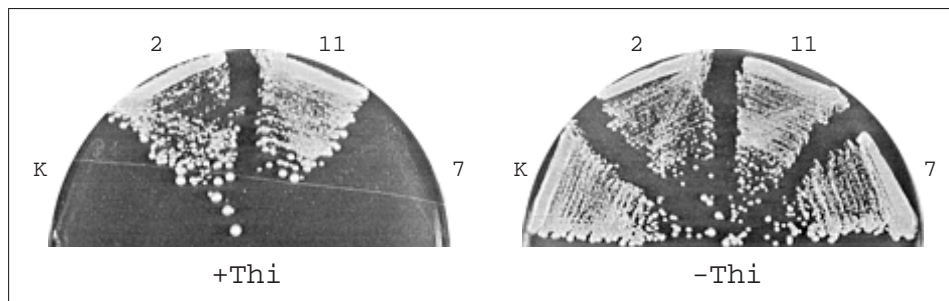


Abb. 3.19: Komplementierung des konditional letalen Stamms mit dem *srp2* Gen. Links: Medium mit Thiamin. Es sind: K, pUR19 Vektor; 2, pUR19 mit 3,3 kb großem *srp2* Fragment; 11, pUR19 mit 3,5 kb großem *srp2* Fragment und 7, pUR19 mit 2,1 kb großem *srp2* Fragment. Rechts: Medium ohne Thiamin.

3.6 Charakterisierung des konditional letalen *srp2* Stamms

In Gegenwart von Thiamin stellt der konditional letale Stamm das Wachstum ein. Um das Wachstumsverhalten näher zu untersuchen, wurde der Stamm in Minimalmedium mit und ohne Thiamin kultiviert und das Wachstum der Zellen verfolgt. Dazu wurde 12 Stunden nach dem Animpfen in regelmäßigen Zeitintervallen die Optischen Dichte (OD₆₀₀) der Kulturen bestimmt.

Die Abb.3.20 zeigt den Verlauf der Optischen Dichte der Kulturen über einen Zeitraum von 12 bis 35 Stunden nach dem Animpfen. Die Zellen können in thiaminfreiem Medium wachsen und erreichen nach ca. 30 Stunden die stationäre Phase. Dagegen stellen die Zellen in Medium mit Thiamin nach ca. 20 Stunden das Wachstum ein.

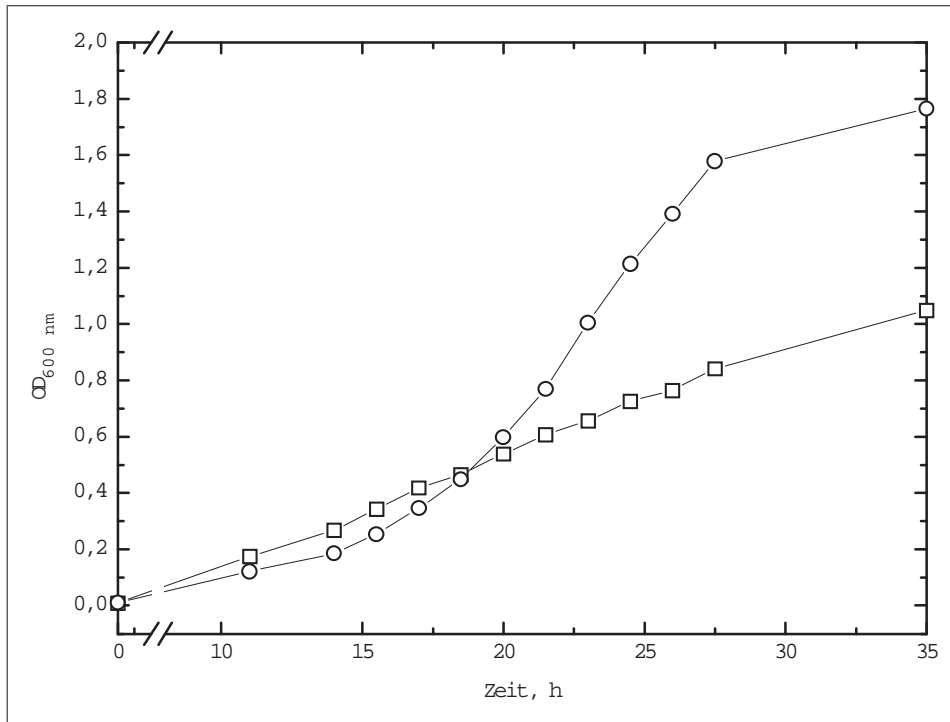


Abb. 3.20: Wachstumskurve des konditional letalen Stamms in Minimalmedium mit und ohne Thiamin bei 30 °C. Das Wachstum der Zellen wurde über einen Zeitraum von 12 bis 35 Stunden nach dem Animpfen verfolgt. Es wurde die Optische Dichte der Kulturen bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Es bedeuten: ○, Kultur ohne Thiamin; □, Kultur mit Thiamin.

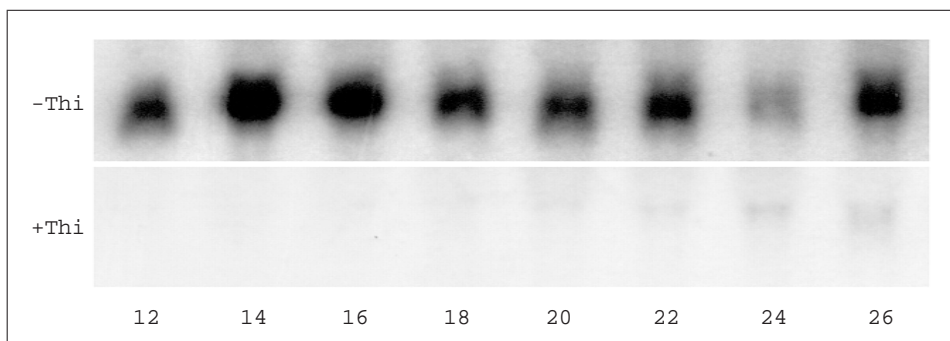


Abb. 3.21: Northern zum Nachweis der *srp2* mRNA im konditional letalen Stamm. Es bedeutet: +Thi, Medium mit Thiamin; -Thi, Medium ohne Thiamin. Die Proben wurden den Kulturen zu den angegebenen Zeiten (Stunden nach dem Animpfen) entnommen. Es wurden jeweils 15 µg Gesamt-RNA aufgetragen. Als Sonde diente das 1.100 bp große BamHI Fragment der *srp2* cDNA.

Wenn man eine Generationszeit von 3 Stunden zugrundelegt, bedeutet das, daß sich diese Zellen nach dem Animpfen noch ca. viermal teilen, bis sie das Wachstum einstellen.

Um zu untersuchen, ab welchem Zeitpunkt die Expression von *srp2* vollständig reprimiert ist, wurde eine Northern-Hybridisierung durchgeführt. Dazu wurde aus den Zellen Gesamt-RNA isoliert und in einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Nylonmembran wurde die RNA mit der *srp2* cDNA hybridisiert.

Wie aus dem Autoradiogramm in der Abb.3.21 hervorgeht, ist die *srp2* mRNA in den Zellen, die in thiaminfreiem Medium gewachsen sind, zu jeder Zeit nachweisbar. In den Zellen, die im Medium mit Thiamin gewachsen sind, konnte bereits nach 12 Stunden keine *srp2* mRNA mehr detektiert werden.

Entsprechend den Angaben aus der Literatur wird der Wildtyp *nmt1* Promotor bereits 3 Stunden nachdem die *S.pombe* Zellen in Medium mit Thiamin überführt wurden vollständig reprimiert (Maudrell, 1989).

Folglich verarmen die Zellen nach der Zugabe von Thiamin allmählich an Srp2. Wie die Wachstumskurve in der Abb.3.20 zeigt, dauert dieser Vorgang etwa 20 Stunden, bis das Wachstum der Zellen zum Stillstand kommt. Dies eröffnet die Möglichkeit zu untersuchen, welche physiologischen Auswirkungen die Verarmung von Srp2 auf die *S.pombe* Zellen hat. Zunächst wurde untersucht, ob die Zellen in einer bestimmten Phase des Zellzyklus arretieren, wenn sie das Wachstum in Gegenwart von Thiamin einstellen. Dazu wurde eine FACS-Analyse durchgeführt.

3.6.1 FACS-Analyse des konditional letalen *srp2* Stamms

Mit dem Verfahren der FACS-Analyse kann die Größe und der DNA-Gehalt der Zellen einer Kultur quantitativ erfaßt werden. Die Größe und der DNA-Gehalt geben Auskunft darüber, in welcher Phase des Zellzyklus sich eine Zelle befindet.

Wie bei höheren Eukaryonten ist der Zellzyklus von *S.pombe* in vier Phasen unterteilt und besteht aus der G1-, S-, G2- und der M-Phase. Allerdings weist der Zellzyklus von *S.pombe* einige Besonderheiten auf:

S.pombe Zellen haben eine verlängerte G2-Phase, die bis zu 75 % des Zellzyklus einnimmt (Mitchison, 1970). Bei der Mitose wird die Kernmembran nicht aufgelöst. Deshalb finden sämtliche Vorgänge während der Mitose innerhalb des Zellkerns statt. Die Teilung des Zellkerns geht der Zellteilung voraus, so daß die Zellen mit einem DNA-Gehalt von 2C in die G1-Phase eintreten. Erst in der G1-Phase wird ein Septum gebildet, das die beiden Tochterzellen voneinander trennt. Deshalb haben über 90 % der Zellen einer wachsenden *S.pombe* Kultur einen DNA-Gehalt von 2C und eine sehr einheitliche Größe. Daher wird bei der Messung der Zellgröße und des DNA-Gehalts einer solchen Kultur mit Hilfe der FACS-Analyse jeweils nur ein Peak erhalten. Dies ist in der Abb.3.22 am Beispiel einer Kultur des Wildtyp Stamms L972 in Vollmedium gezeigt (L972, wt).

Wenn haploide *S.pombe* Zellen unter nährstofflimitierenden Bedingungen kultiviert werden, dann wird die Paarung der Zellen induziert. Dabei arretieren die Zellen in der G1-Phase. In dieser Phase haben die Zellen einen DNA-Gehalt von 1C. Dies ist in der Abbildung 3.22 am Beispiel einer Kultur des Stamms L972 demonstriert, die unter stickstofflimitierenden Bedingungen gewachsen ist (L972, -N). Wie die Messung der Zellgröße zeigt, sind diese Zellen kleiner als in der G2-Phase. Dies ist an dem nach „nach links verschoben“ Peak zu erkennen. Weil nicht alle Zellen der Kultur in der G1-Phase arretiert waren, wurden bei der Messung des DNA-Gehalts zwei Peaks erhalten, die einen DNA-Gehalt von 1C und 2C repräsentieren.

Um das Wachstumsverhalten des konditional letalen Stamms mit Hilfe der FACS-Analyse zu untersuchen, wurde der Stamm für 20, 24 und 28 Stunden in Medium mit und ohne Thiamin kultiviert.

Wie die Abb.3.22 zeigt, haben über 90 % der Zellen einen DNA-Gehalt von 2C, die für 20 Stunden in Medium ohne Thiamin gewachsen sind (*srp2::his7*, 20 h -T). Die Größe dieser Zellen entspricht der Größe von Wildtyp-Zellen (vgl. L972, wt). Demnach wächst der Stamm unter diesen Bedingungen wie ein Wildtyp *S.pombe* Stamm.

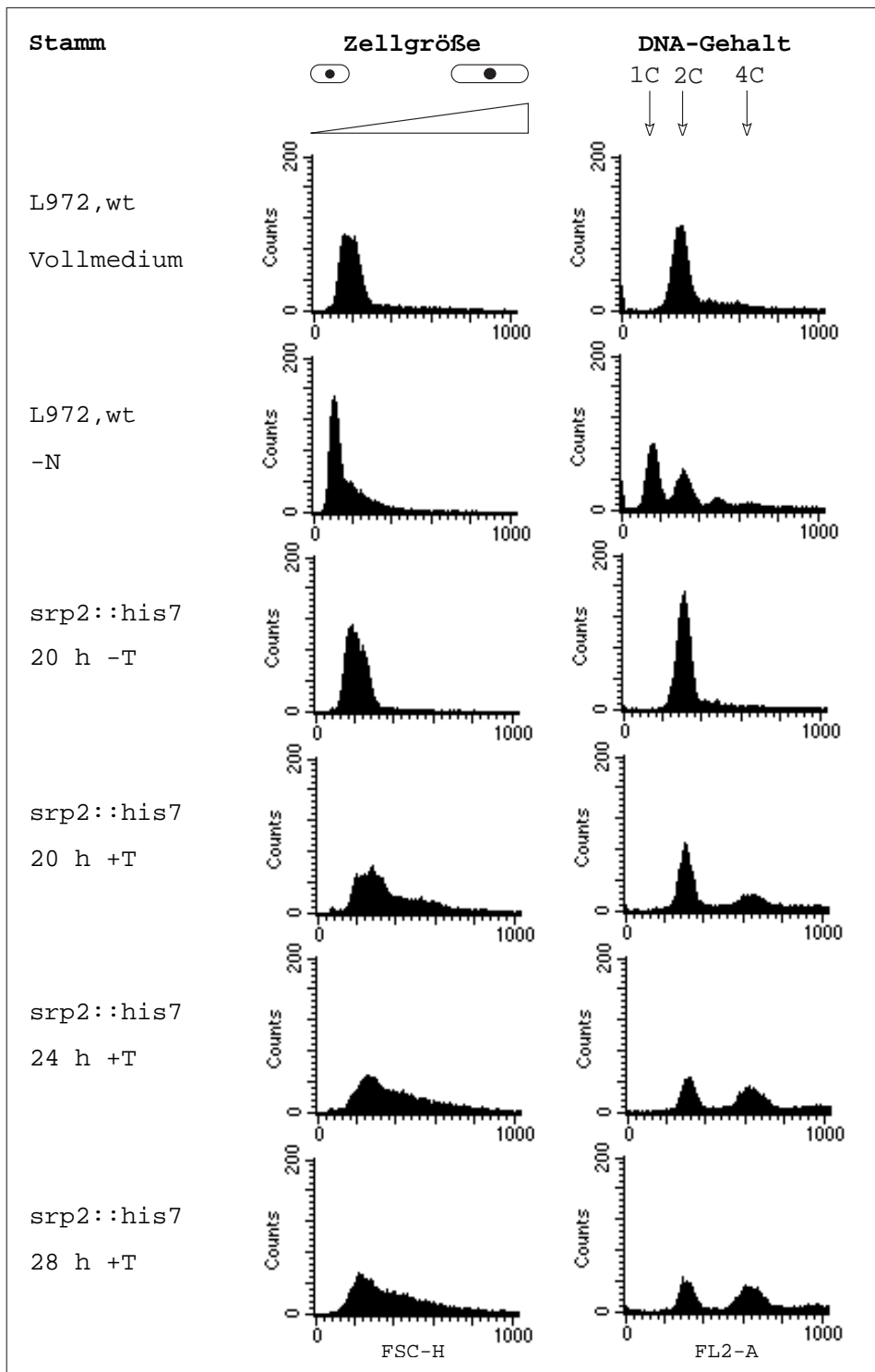


Abb. 3.22: FACS-Analyse des konditional letalen Stamms (*srp2::his7*), nach 20, 24 und 28 Stunden Wachstum in Medium mit (+T) und ohne Thiamin (-T). Es sind die Meßwerte gezeigt, die mit dem FSC-H (Zellgröße) und dem FL2-A Detektor (DNA-Gehalt) erhalten wurden. Als Kontrolle sind die Meßwerte eines Wildtyp Stamms gezeigt, der in Vollmedium (L972, wt) und in SSL Medium (L972, -N) unter stickstofflimitierenden Bedingungen gewachsen ist.

Die Wachstumskurve in der Abb.3.20 hat ergeben, daß der konditional letale Stamm in Gegenwart von Thiamin das Wachstum nach ca. 20 Stunden einstellt. Hier ist mit Hilfe der FACS-Analyse zu beobachten, daß die durchschnittliche Größe der Zellen zugenommen hat, denn der Peak ist „nach rechts verschoben“.

Darüber hinaus hat der Peak eine größere Streuung bekommen, die darauf hinweist, daß die Zusammensetzung der Kultur sehr heterogen geworden ist, d. h. sowohl große als auch kleine Zellen enthält (srp2::his7, 20 h +T).

Außerdem ist zu erkennen, daß der Anteil von Zellen mit einem DNA-Gehalt von 2C zurückgegangen ist. Stattdessen tritt ein neuer Peak auf, der zeigt, daß ein Teil der Zellen einen DNA-Gehalt von 4C bekommen hat. Nach 24 Stunden ist der Anteil dieser Zellen auf etwa 50 % gestiegen. Dabei hat die Größe der Zellen noch etwas zugenommen (srp2::his7, 24 h +T). Doch bis zum Zeitpunkt von 28 Stunden hat sich die Zusammensetzung der Kultur nicht mehr verändert (srp2::his7, 28 h +T). Wie die Wachstumskurve in der Abb.3.20 (S. 59) zeigt, hat der Stamm zu diesem Zeitpunkt das Wachstum vollkommen eingestellt. Das deutet darauf hin, daß die Funktion von Srp2 nicht für die S-Phase, aber während der G2-, M- und G1-Phase erforderlich ist.

Um das Ergebnis der FACS-Analyse zu überprüfen, wurden die Kulturen mikroskopisch untersucht. Dafür wurden die Zellen nach 24 Stunden Wachstum mit Glutaraldehyd/Paraformaldehyd fixiert und mit DAPI gefärbt, um den Zellkern sichtbar zu machen.

Wie die Abb.3.23 zeigt, haben die Zellen, die in Medium ohne Thiamin gewachsen sind, einen sehr einheitlichen Phänotyp: Diese Zellen sind ca. 8 bis 14 µm lang und besitzen einen, manchmal auch zwei Zellkerne. Das bestätigt das Ergebnis der FACS-Analyse und zeigt, daß die Zellen unter diesen Bedingungen wachsen können.

Dagegen haben die Zellen aus der Kultur mit Thiamin einen sehr heterogenen Phänotyp: Die Kultur enthält Zellen von sehr unterschiedlicher Länge, die von 8 bis zu 30 µm reicht. Es fällt auf, daß sich der Zellkern der verlängerten Zellen nur sehr schlecht mit DAPI anfärben läßt. In diesen Zellen ist die Färbung auf die Zellmitte konzentriert. Sie erstreckt sich aber häufig auch bis in das Cytoplasma.

Vermutlich konnten diese Zellen keine Mitose mehr durchführen und waren nicht mehr in der Lage sich zu teilen, denn sie haben nur einen Zellkern und kein Septum gebildet. Wie die FACS-Analyse zeigt, waren diese Zellen trotzdem in der Lage ihre DNA zu replizieren, das zu einem DNA-Gehalt von 4C geführt hat.

In der Kultur kommen auch Zellen vor, deren Morphologie sich nicht von den Zellen unterscheidet, die in Medium ohne Thiamin gewachsen sind. Das bedeutet, daß nicht alle Zellen in der gleichen Phase des Zellzyklus arretiert sind.

Deshalb ist anzunehmen, daß der beobachtete Phänotyp eine indirekte Folge der Repression von *srp2* ist. Möglicherweise wird das Wachstum der Zellen gehemmt, weil die Zellen keine prä-mRNA mehr spleißen können. Da etwa die Hälfte der *S.pombe* Gene Introns enthalten (Prabhala *et al.*, 1992), wäre es möglich, daß davon auch solche Gene betroffen sind, die für das Wachstum der *S.pombe* Zellen essentiell sind. Deshalb wurde mit Hilfe einer Northern-Hybridisierung untersucht, ob der konditional letale Stamm in Gegenwart von Thiamin noch *tfII*d prä-mRNA spleißen kann.

3.6.2 Der konditional letale *srp2* Stamm akkumuliert keine *tfII*d prä-mRNA

Für die Northern-Hybridisierung wurde aus dem konditional letalen Stamm nach 24 und 28 Stunden Wachstum in Medium mit und ohne Thiamin Gesamt-RNA isoliert. Die RNA wurde in einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit der *tfII*d cDNA hybridisiert. Als Kontrolle wurde Gesamt-RNA aus dem *S.pombe* Stamm SL11 aufgetragen, der das temperatursensitive Allel *prp4-73^{ts}* besitzt und bei der restriktiven Temperatur von 36 ° C prä-mRNA akkumuliert.

In der Abb.3.24 ist das Autoradiogramm dieser Northern-Hybridisierung abgebildet. Wie die Abbildung zeigt, akkumulieren die Zellen in Gegenwart von Thiamin weder nach 24, noch nach 28 Stunden *tfII*d prä-mRNA.

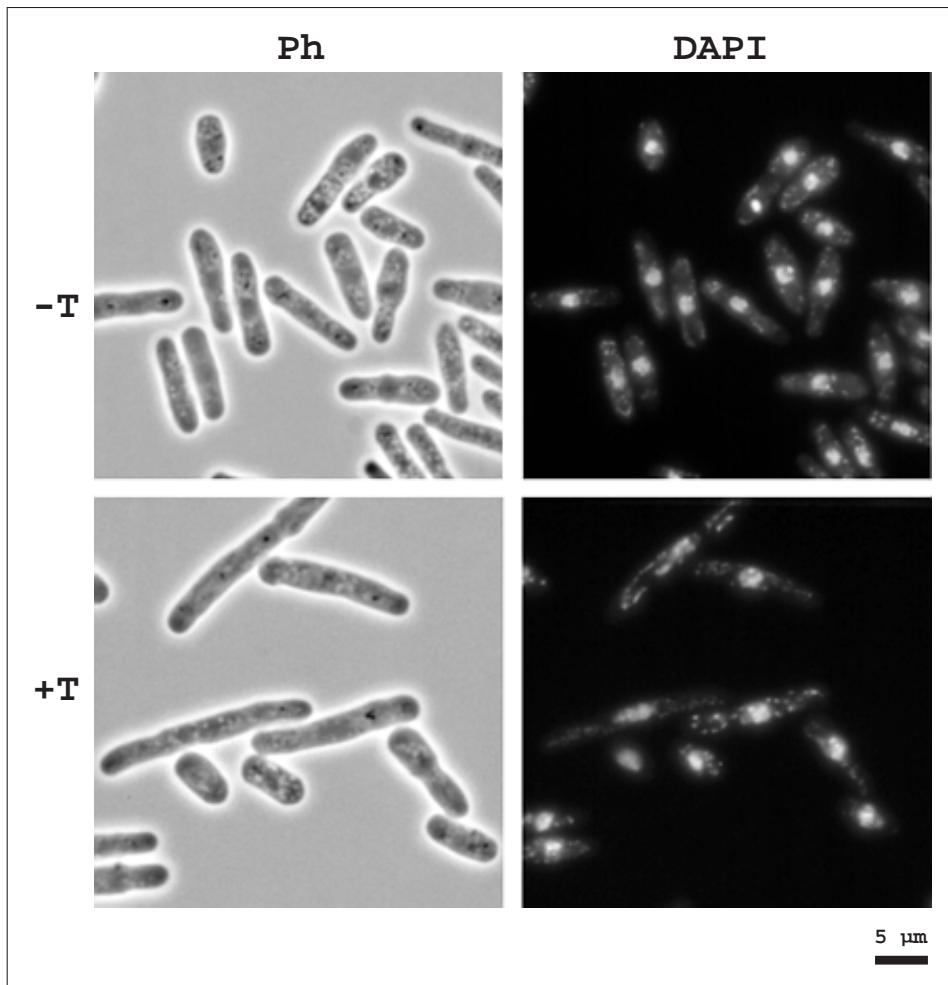


Abb. 3.23: Mikroskopische Untersuchung des konditional letalen *srp2* Stamms nach 24 Stunden Wachstum in Medium mit (+T) und ohne Thiamin (-T). Für die Färbung des Zellkerns mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs DAPI wurden die Zellen mit Paraformaldehyd und Glutaraldehyd fixiert. Ph: Aufnahmen der Zellen im Phasenkontrast. DAPI: Färbung der gleichen Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI. Der Balken entspricht einer Länge von etwa 5 μm .

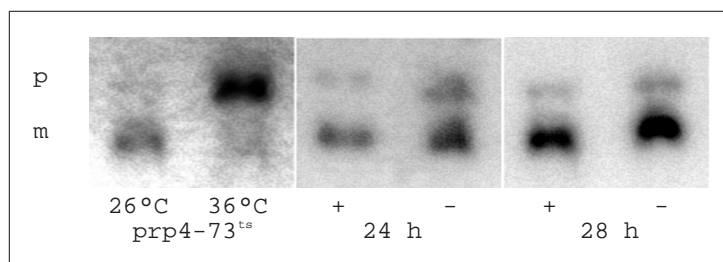


Abb. 3.24: Northern-Hybridisierung der Gesamt-RNA aus dem konditional letalen Stamm mit der *tflId* cDNA. Es bedeutet *prp4-73^{ts}*: Gesamt-RNA aus dem temperatursensitiven Stamm SL11 bei 26 °C und 36 °C (Kontrolle); 24 h: Gesamt-RNA aus dem konditional letalen Stamm nach 24 Stunden Wachstum in Medium mit (+) und ohne (-) Thiamin; 28 h: Gesamt-RNA aus dem konditional letalen Stamm nach 28 Stunden Wachstum in Medium mit (+) und ohne (-) Thiamin; p: prä-mRNA, m: mRNA. Es wurden jeweils 15 μg Gesamt-RNA aufgetragen. Als Sonde wurde die *tflId* cDNA verwendet.

Dieses Ergebnis könnte bedeuten, daß Srp2 nicht für das Spleißen von prä-mRNA erforderlich ist und eine andere Funktion ausführt, als bisher angenommen wurde. Eine andere Möglichkeit wäre, daß Srp2 nur für das Spleißen von einer oder mehreren spezifischen prä-mRNAs gebraucht wird und deshalb keine Akkumulation von *tfIId* prä-mRNA beobachtet wurde.

Auch bei höheren Eukaryonten werden die SR-Proteine nicht immer für das Spleißen von allen prä-mRNAs benötigt: So konnte sich z. B. die Fruchtfliege *Drosophila* nach der Deletion des SR-Proteins B52/SRp55 zwar nur noch bis zum zweiten Larvenstadium entwickeln, doch weder das konstitutive noch das alternative Spleißen von fünf getesteten prä-mRNAs ist dadurch beeinträchtigt gewesen (Ring & Lis, 1994). Dennoch kann mit diesem SR-Protein das Spleißen von prä-mRNA in HeLa S100 *in vitro* Spleißextrakten komplementiert werden.

Eine spezifische Funktion von Srp2 würde auch die Ergebnisse erklären, die bei der Überexpression der RNA-Bindungsdomänen in *S.pombe* erhalten wurden: Im Gegensatz zu Srp1 wurde bei der Überexpression der ersten RNA-Bindungsdomäne von Srp2 keine Akkumulation von *tfIId* prä-mRNA beobachtet. Dies könnte durch die unterschiedliche RNA-Bindungsspezifität der RNA-Bindungsdomänen von Srp1 und Srp2 bedingt sein.

Einen weiteren Hinweis auf eine spezifische Funktion von Srp2 lieferte die Fusion mit der RNA-Bindungsdomäne von Srp1. Durch die zweite RNA-Bindungsdomäne wird die Akkumulation von *tfIId* prä-mRNA aufgehoben, die durch die Überexpression der RNA-Bindungsdomäne von Srp1 verursacht wird (s. S.54, Abb.3.15, RBD_{Srp1}RDB2-RRD_{Srp2}). Das könnte bedeuten, daß die spezifische Funktion von Srp2 von der zweiten RNA-Bindungsdomäne bestimmt wird.

Durch den konditional letalen *srp2* Stamm eröffnete sich die Möglichkeit, die Funktion der RNA-Bindungsdomänen von Srp1 und Srp2 mit Hilfe von Komplementierungsexperimenten *in vivo* zu untersuchen.

3.7 Komplementierung des konditional letalen *srp2* Stamms

Um die Komplementierungstests durchführen zu können, mußte zunächst ein Vektor konstruiert werden, der die Expression einer cDNA im konditional letalen Stamm ermöglicht. Für die Herstellung dieses Expressionsvektors wurde der Promotor des *srp2* Gens verwendet.

3.7.1 Herstellung eines Expressionsvektors mit dem Promotor des *srp2* Gens

Bei der Charakterisierung des konditional letalen *srp2* Stamms wurde festgestellt, daß die beiden 3,3 und 3,5 kb großen genomischen Fragmente des *srp2* Gens, den Stamm in Gegenwart von Thiamin komplementieren können (s. S.58, Abb.3.19). Die Fragmente besitzen jeweils einen 300 und 1.500 bp großen Bereich der 5'-flankierenden Region des *srp2* Gens (s. S.42, Abb.3.3, Nr.2 und 11).

Weil das 3,3 kb große Fragment den konditional letalen Stamm komplementieren kann, ist anzunehmen, daß sich in der 300 bp großen 5'-flankierenden Region der vollständige *srp2* Promotor befindet. Diese Region wurde mit Hilfe einer PCR-Reaktion amplifiziert (s. Material und Methoden S.15). Das 300 bp große PCR-Produkt wurde in den Vektor pUC19 ligiert. Anschließend wurde der *nmt1* Promotor aus dem Vektor pREP2 (Maundrell, 1993) entfernt und durch das 300 bp große PCR-Produkt ersetzt.

Auf diese Weise wurde ein Expressionsvektor erhalten, der den *srp2* Promotor enthält. Eine Restriktionskarte des Vektors, der pML1 genannt wurde, ist in der Abb.3.25 abgebildet.

Die Funktion des *srp2* Promotors wurde durch einen Komplementierungstest überprüft. Dafür wurde die *srp2* cDNA in den Vektor ligiert und in den konditional letalen Stamm transformiert. Als Kontrolle diente der Vektor ohne Insert.

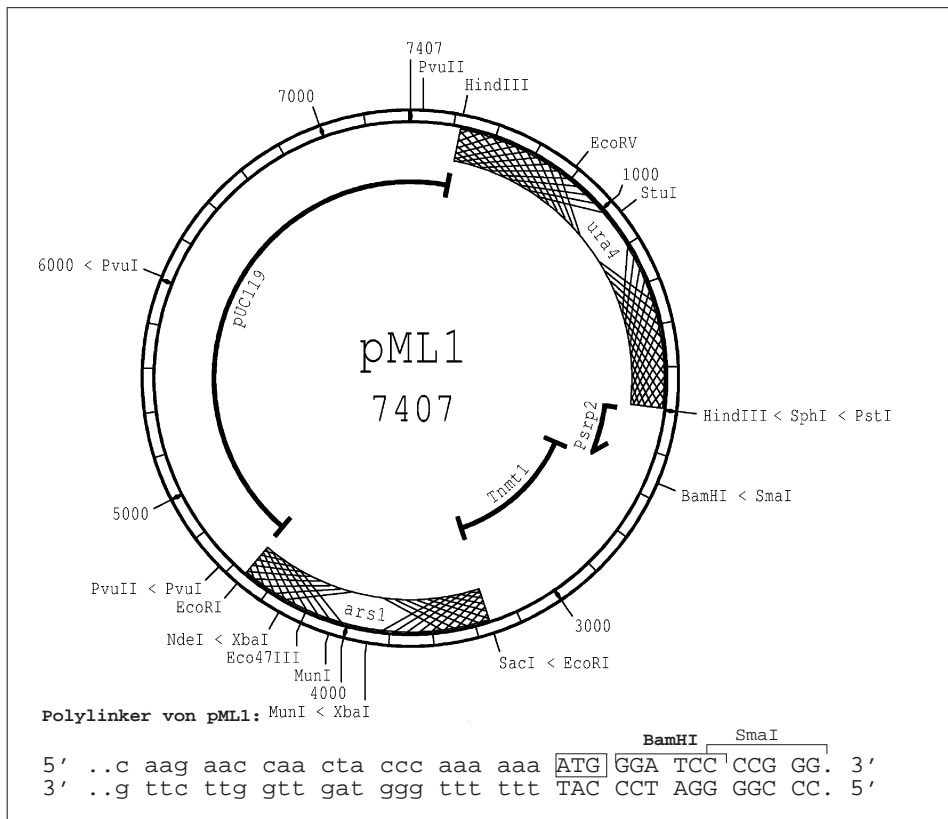


Abb. 3.25: Vektorkarte von pML1. Es bedeuten: Psrp2, *srp2* Promotor; Tnmt1, *nmt1* Terminator. Der Vektor enthält das *arsI* Element und das *ura4⁺* Gen für die Selektion in *S.pombe*, sowie Sequenzen aus dem Vektor pUC119 zur Selektion in *E.coli*. Die Sequenz des pML1 Polylinkers, der auf den *srp2* Promotor folgt, ist unten angegeben. Das Startcodon ATG, das für die Translation verwendet wird, befindet sich vor der BamHI Schnittstelle.

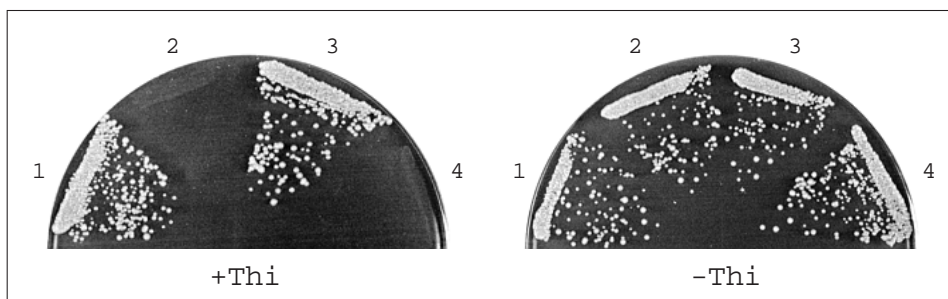


Abb. 3.26: Komplementierung des konditional letalen Stamms mit der *srp2* cDNA (1), dem Vektor pML1 (2), dem Konstrukt RBD_{Srp1}RDB2-RRD_{Srp2} (3) und der Srp1 cDNA (4). Links: Medium mit Thiamin (+Thi). Rechts: Medium ohne Thiamin (-Thi).

Nach der Transformation wurde nach Uracil prototrophen Transformanten selektiert. Anschließend wurde das Wachstum der Transformanten auf Medium mit und ohne Thiamin getestet. Wie die Abb.3.26 zeigt, wird der Stamm von der *srp2* cDNA (Abb.3.26; +Thi, 1), aber nicht durch den Vektor komplementiert (Abb.3.26; +Thi, 2). Folglich lassen sich mit Hilfe dieses Vektors cDNAs im konditional letalen *srp2* Stamm exprimieren.

3.7.2 Die RNA-Bindungsdomäne von Srp1 kann die Funktion der ersten RNA-Bindungsdomäne von Srp2 ersetzen

Um zu untersuchen, ob das Konstrukt, das aus der RNA-Bindungsdomäne von Srp1 sowie der zweiten RNA-Bindungsdomäne und der argininreichen Domäne von Srp2 zusammengesetzt ist (s. S.54, Abb.3.15, RBD_{Srp1}RDB2-RRD_{Srp2}), den konditional letalen Stamm komplementieren kann, wurde es in den Vektor pML1 ligiert.

Zusätzlich wurde getestet, ob der Stamm von Srp1 komplementiert wird. Dafür wurde die *srp1* cDNA in den Vektor pML1 ligiert. Die Konstrukte wurden in den konditional letalen *srp2* Stamm transformiert und das Wachstum der Transformanten auf Medium mit und ohne Thiamin getestet. Wie die Abb.3.26 zeigt, wird der Stamm nicht von der *srp1* cDNA komplementiert (+Thi, 4). Das bedeutet, daß Srp1 und Srp2 unterschiedliche Funktionen besitzen.

Bereits bei der Überexpression des Konstrukts RBD_{Srp1}RDB2-RRD_{Srp2} wurde beobachtet, daß die zweite RNA-Bindungsdomäne von Srp2 die Funktion der RNA-Bindungsdomäne von Srp1 verändert. Wie die Abbildung 3.26 zeigt (+Thi, 3), komplementiert dieses Konstrukt den konditional letalen Stamm.

Demnach wird die Funktion der RNA-Bindungsdomäne von Srp1 durch die Fusion mit der zweiten RNA-Bindungsdomäne so verändert, daß sie die erste RNA-Bindungsdomäne von Srp2 ersetzen kann. Das deutet darauf hin, daß die spezifische Funktion von Srp2 hauptsächlich von der zweiten RNA-Bindungsdomäne bestimmt wird.

Darüber hinaus demonstriert dieser Versuch den besonderen Aufbau der SR-Proteine: Untersuchungen an den SR-Proteinen aus dem Menschen haben bereits gezeigt, daß diese Proteine eine modulare Struktur besitzen. Zum Beispiel haben die Spleißfaktoren SC35 und ASF/SF2 eine bzw. zwei RNA-Bindungsdomänen. Die RNA-Bindungsdomäne von SC35 ist in der Lage die Funktion der ersten RNA-Bindungsdomäne von ASF/SF2 zu ersetzen. Dabei wurde *in vitro* weder die Spleißaktivität noch die Spezifität von ASF/SF2 verändert (Chandler *et al.*, 1997).

Die Komplementierung des konditional letalen Stamms zeigt damit erstmals, daß es möglich ist die RNA-Bindungsdomänen auszutauschen, ohne ihre Funktion *in vivo* zu beeinträchtigen.

3.7.3 Gerichtete Mutagenese der *srp2* cDNA

Um zu untersuchen welche der verschiedenen Sequenzmotive für die Funktion von Srp2 essentiell sind, wurde die *srp2* cDNA mit Hilfe einer gerichtete Mutagenese nach dem Verfahren von Kunkel *et al.* (1987) mutiert. Dafür wurde die *srp2* cDNA in den M13 Vektor M13mp19 ligiert. Die Mutagenese wurde mit Hilfe der in der Tabelle 2.7 aufgeführten Oligonukleotide durchgeführt (s. Material und Methoden S.34). Es wurden verschiedene Mutationen in den RNA-Bindungsdomänen und in der argininreichen Domäne erzeugt:

In der ersten RNA-Bindungsdomäne wurde die Signatursequenz DARDAR in die Sequenz NVNNVQ mutiert. Außerdem wurde die in allen SR-Proteinen mit zwei RNA-Bindungsdomänen konservierte Sequenz SWQDLKD durch die Sequenz ALQNVRN ersetzt (s. S.51). Es wurde auch eine Doppelmutante erzeugt, in der beide Signatursequenzen mutiert sind. Zusätzlich wurde eine cDNA hergestellt, in der alle 14 Tyrosine, die sich in der argininreichen Domäne im Sequenzmotiv DEYRR befinden, durch die Aminosäure Phenylalanin ausgetauscht sind (Gross, 1999).

Bei der Mutagenese wurde darauf geachtet, daß die Sequenzmotive durch Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften ersetzt werden, um die Sekundärstruktur von Srp2 möglichst nicht zu verändern.

Die Auswirkungen der Mutationen wurde *in vivo* durch die Komplementierung des konditional letalen *srp2* Stamms getestet. Dafür wurden die mutierten cDNAs in den Vektor pML1 ligiert.

Durch die Mutagenese der beiden SR-Elemente SR1 und SR2 wurde bereits gezeigt, daß diese Sequenzmotive für den Transport von Srp2 in den Zellkern erforderlich sind und als Kerntransportsignal dienen (s. S.49, Abb.3.10). In den beiden SR-Elementen wurden sämtliche Serine durch Alanin ersetzt. Um die Auswirkungen dieser Mutationen auf das Wachstum des konditional letalen *srp2* Stamms zu untersuchen, wurden auch diese mutierten cDNAs in den Vektor pML1 ligiert.

Nach der Transformation in den konditional letalen Stamm wurde das Wachstum der Transformanten durch Ausstreichen auf Minimalmedium mit und ohne Thiamin getestet. Als Kontrolle diente die *srp2* cDNA im Vektor pML1. Das Ergebnis dieses Komplementierungstests ist in der Abbildung 3.27 gezeigt und in der Abbildung 3.28 zusammengefaßt.

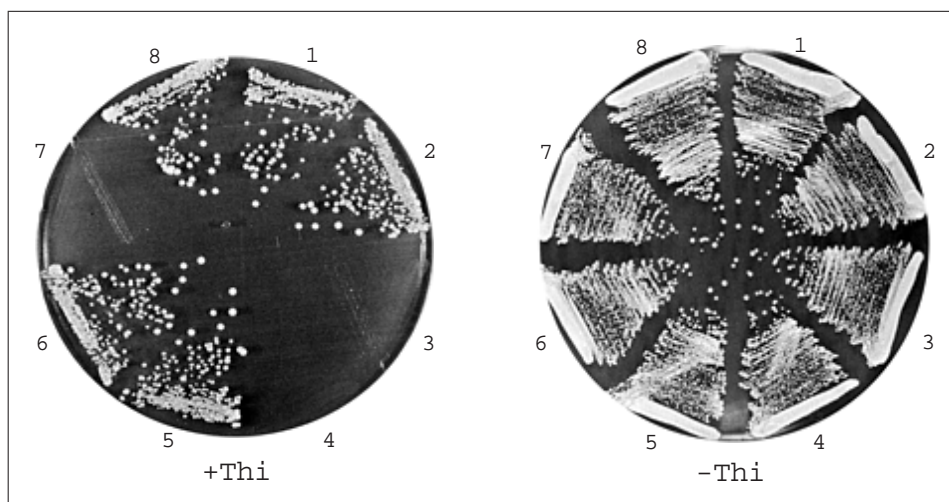


Abb. 3.27: Komplementierung des konditional letalen Stamms mit den mutierten *srp2* cDNAs. Wachstum der Transformanten nach 5 Tagen bei 30 ° C. Links, Medium ohne Thiamin (-Thi); Rechts, Medium mit Thiamin (+Thi). Es sind: 1, *srp2* cDNA; 2, RBD1*; 3, RBD2*; 4, RBD1*RBD2*; 5, SR1*; 6, SR2*; 7, SR1*SR2*; 8, DEYRR*. Alle Konstrukte wurden mit dem Vektor pML1 expriert.

Wie bereits gezeigt wurde, ist die *srp2* cDNA in der Lage den konditional letalen Stamm zu komplementieren. Dagegen haben die Mutationen in den Signatursequenzen der beiden RNA-Bindungsdomänen unterschiedliche Auswirkungen auf das Wachstum des Stamms:

Während die cDNA mit der Mutation in der Signatursequenz DARDAR den Stamm komplementiert, waren die cDNAs mit der Mutation in der Signatursequenz SWQDLKD nicht in der Lage den Stamm zu komplementieren.

Die Signatursequenz der ersten RNA-Bindungsdomäne (DARDAR) liegt in unmittelbarer Nähe des RNP-1 Motivs. Untersuchungen an verschiedenen RNA-bindenden Proteinen haben ergeben, daß die aromatischen Aminosäuren des RNP-1 Motivs für die Bindung an die RNA erforderlich sind. Bei der Mutagenese von Srp2 wurden diese Aminosäuren jedoch nicht verändert. Das mutierte Protein sollte daher noch in der Lage sein an RNA zu binden.

Von [Caceres & Krainer \(1993\)](#) wurden vergleichbare Untersuchungen mit dem SR-Protein ASF/SF2 aus dem Menschen durchgeführt: Nach der Mutagenese der Sequenz

	RBD1	RBD2	RRD SR1 SR2	+Thi
1.) Srp2	DARDAR	SWQDLKD	SRFRSRS SRSPSP	+
2.) RBD1*	NVNNVQ			+
3.) RBD2*		ALQNVRN		-
4.) RBD1*RBD2*	NVNNVQ	ALQNVRN		-
5.) SR1*			ARFRARA	+
6.) SR2*			ARAPAP	+
7.) SR1*SR2*			ARFRARA ARAPAP	-
8.) DEYRR*			DEFRR	+

Abb. 3.28: Komplementierung des konditional letalen Stamms mit den mutierten cDNAs von *srp2*. Es bedeuten: Rechteck, RBD1; Sechseck, RBD2; Oval, RRD. Die Signatursequenzen der RNA-Bindungsdomänen und deren Punktmutationen sind jeweils angegeben. Das Ergebnis der Komplementierung ist jeweils angezeigt (+Thi).

DPRDAE, die sich an der gleichen Position wie die Sequenz DARDAR befindet (s. Abb. 3.1, S. 39), wurden *in vitro* keine Auswirkungen auf das konstitutive und alternative Spleißen festgestellt. Erst nach der Mutagenese der aromatischen Aminosäuren im RNP-1 Motiv komplementierte ASF/SF2 *in vitro* keine Spleißreaktionen mehr. Die Mutagenese von Srp2 zeigt, daß dieses Sequenzmotiv auch *in vivo* nicht für die Funktion erforderlich ist.

Im Gegensatz dazu führt die Mutation in der Signatursequenz der zweiten RNA-Bindungsdomäne zum Verlust der Funktion von Srp2. Das Sequenzmotiv SWQDLKD ist in allen SR-Proteinen mit zwei RNA-Bindungsdomänen enthalten und ist in Position und Sequenz hochkonserviert. Dieser Komplementierungsversuch zeigt zum ersten Mal, daß dieses Sequenzmotiv *in vivo* eine essentielle Funktion hat.

Dennoch ist Bedeutung dieser Signatursequenz für die Funktion der SR-Proteine unklar. Das Sequenzmotiv SWQDLKD liegt zwischen dem RNP-1 und RNP-2 Sequenzmotiv, die in der zweiten RNA-Bindungsdomäne nur schwach konserviert sind. Es ist daher unwahrscheinlich, daß es an einer direkten Interaktion mit der RNA beteiligt ist. Möglicherweise wird dieses Sequenzmotiv für die Wechselwirkung mit anderen Spleißfaktoren benötigt (s. Diskussion).

Durch die Fusion mit dem Green Fluorescent Protein konnte gezeigt werden, daß Srp2 im Zellkern von *S. pombe* lokalisiert ist. Srp2 gelangt nicht mehr in den Kern, wenn die beiden SR-Elemente mutiert sind. Dies ist wahrscheinlich die Ursache dafür, weshalb diese cDNA den konditional letalen Stamm nicht komplementiert. Dieses Ergebnis zeigt, daß für die Funktion von Srp2 eine Lokalisation im Zellkern erforderlich ist.

Durch die Mutagenese des Sequenzmotivs DEYRR wurde Srp2 am stärksten verändert. Weil dieses Sequenzmotiv elfmal in der argininreichen Domäne vorkommt und vielleicht als Phosphorylierungsstelle einer Proteinkinase dienen könnte, wurden sämtliche Tyrosine durch die Aminosäure Phenylalanin ersetzt. Die Aminosäure Phenylalanin kann nicht phosphoryliert werden, weil sie keine 4'-OH-Gruppe besitzt.

Wie die Abbildung 3.28 zeigt, wurde der konditional letale *srp2* Stamm trotzdem von dieser mutierten cDNA komplementiert. Demnach ist dieses Sequenzmotiv nicht für die Funktion von *Srp2* essentiell. Es ist daher unwahrscheinlich, daß es als Phosphorylierungsstelle dient, bzw. eine Phosphorylierung der Tyrosine für die Funktion von *Srp2* erforderlich ist.

3.8 Wird *Srp2* für das Spleißen einer spezifischen prä-mRNA benötigt?

Die Charakterisierung des konditional letalen Stamms sowie die Überexpression von *Srp2* hat ergeben, daß dieses Protein möglicherweise eine spezifische Funktion beim Spleißen von prä-mRNA ausübt, d. h. für das Spleißen von einer oder mehreren spezifischen prä-mRNAs erforderlich sein könnte.

Im konditional letalen Stamm kann die Expression des *srp2* Gens vollständig reprimiert werden. Es könnte sein, daß sich dabei die prä-mRNAs in den Zellen anhäufen, die abhängig von *Srp2* gespleißt werden. Bisher wurde das Spleißen von prä-mRNA im konditional letalen Stamm nur am Beispiel des *tflId* Gens getestet. Um gezielt nach spezifischen mRNAs zu suchen, wurde der Stamm mit Hilfe eines Differential Displays untersucht.

Das Verfahren des Differential Display (DDRT-PCR) wurde ursprünglich für die Identifizierung und Klonierung von differentiell exprimierten Genen in vielzelligen Lebewesen entwickelt. Differentiell exprimierte Gene sind nur in bestimmten Zell- oder Gewebetypen aktiv. Mit Hilfe dieser Methode ist es möglich die cDNAs dieser Gene zu isolieren.

Die Abb.3.29 zeigt die Funktionsweise des Differential Display: Mit Hilfe von Oligo(dT₁₁-V) Primern wird die mRNA eines Zell- oder Gewebetyps revers transkribiert. Die Oligo(dT₁₁) Primer haben an ihrem 3'-Ende jeweils ein C, G oder A Nukleotid. Darum werden diese Oligonukleotide auch als verankerte (anchored) Primer bezeichnet.

Mit Hilfe dieser Primer werden bei der reversen Transkription drei Fraktionen von cDNAs erhalten, deren letztes Nukleotid vor dem Poly(A)-Schwanz ein G, C oder T ist (Abb.3.29). Aus den drei Fraktionen werden anschließend durch die Verwendung von Primern mit zufälliger Sequenz Abschnitte spezifischer mRNAs amplifiziert. Um zu gewährleisten, daß dabei von jeder mRNA einer Probe mindestens ein PCR-Produkt erhalten wird, muß eine angemessene Zahl von Primern verwendet werden.

Die Anzahl der verwendeten Primer richtet sich dabei nach der Genomgröße des untersuchten Organismus. Zum Beispiel werden für die Untersuchung von RNA-Proben aus dem Menschen jeweils drei Oligo(dT₁₁-V) Primer und 48 5'-Primer mit zufällig ausgewählter Sequenz benötigt.

Die PCR-Produkte werden anschließend in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Dabei erhält man ein Bandenmuster, dessen Banden jeweils einen Abschnitt einer spezifischen mRNA repräsentieren. Die Intensität einer Bande gibt dabei Auskunft über die Stärke der Expression einer mRNA in der untersuchten RNA-Probe. Durch den Vergleich der Bandenmuster von RNA-Proben aus verschiedenen Zell- oder Gewebetypen ist es möglich differentiell exprimierte mRNAs zu identifizieren.

Es ist aber auch möglich mit Hilfe dieser Methode alternativ gespleißte mRNAs zu isolieren: Wenn ein Primer in einem Exon bindet, das in verschiedenen Geweben alternativ gespleißt wird, indem z. B. verschiedene Exons miteinander kombiniert werden, dann kann sich die Größe des PCR-Produkts dieser mRNA ändern. Nach der Auftrennung der PCR-Produkte stellt sich diese Größenveränderung auf dem Autoradiogramm als „shift“ der betreffenden Bande dar.

Für das Differential Display wurde aus dem konditional letalen *srp2* Stamm Gesamt-RNA isoliert. Für die RNA-Isolierung wurden die Zellen für 20 Stunden in Minimalmedium mit und ohne Thiamin kultiviert.

Mit den RNA-Proben wurde eine DDRT-PCR durchgeführt. Dazu wurden 3 verankerte Oligo(dT₁₁-V) Primer und 8 5'-Primer mit zufällig ausgewählter Sequenz verwendet. Die PCR-Produkte wurden in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt.

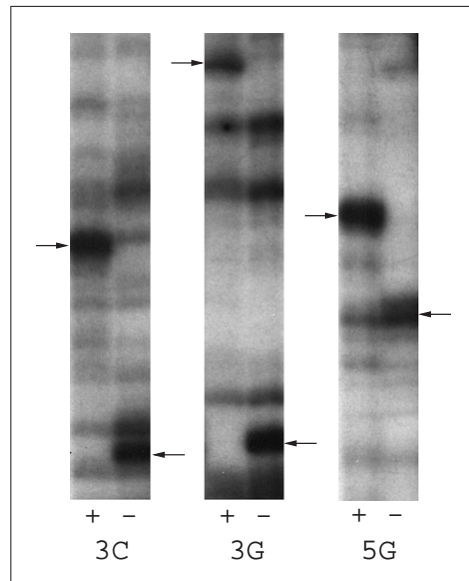


Abb. 3.30: Autoradiogramm der PCR-Produkte, die mit dem Differential Display erhalten wurden. Es sind die PCR-Produkte gezeigt, die mit den Primern (3C), H-AP-3 und H-T₁₁-C, (3G), H-AP-3 und H-T₁₁-G, sowie (5G), H-AP-5 und H-T₁₁-G erhalten wurden. Die Banden, deren Größe bei der Repression von Srp2 zugenommen hat, sind mit Pfeilen markiert. Es bedeuten: (+), PCR-Produkte aus den RNA-Proben mit Thiamin; (-), PCR-Produkte aus den RNA-Proben ohne Thiamin.

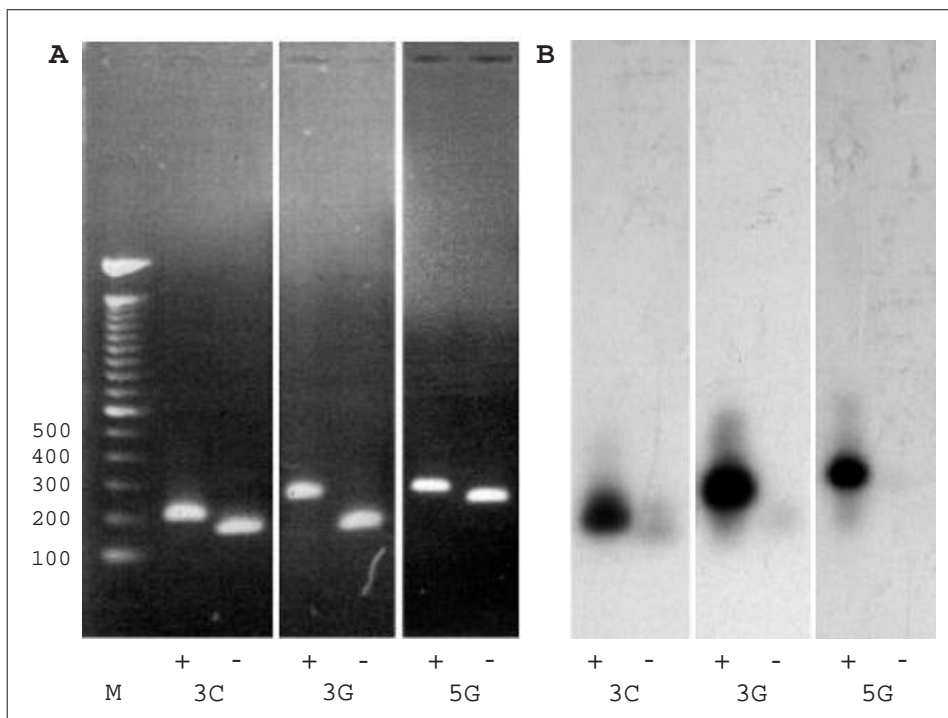


Abb. 3.31: Reamplifikation und Southern-Hybridisierung der PCR-Produkte. (A) Die PCR-Produkte, deren Größe bei der Repression von Srp2 zugenommen hat wurden aus dem Polyacrylamidgel ausgeschnitten und mit den Primerpaaren (3C), H-AP-3 und H-T₁₁-C, (3G), H-AP-3 und H-T₁₁-G sowie (5G), H-AP-5 und H-T₁₁-G reamplifiziert und in einem Agarosegel aufgetrennt. (B) Die Reamplifikate wurden auf eine Nylonmembran transferiert und mit den radioaktiv markierten PCR-Produkten aus den Reaktionen 3C+, 3G+ und 5G+ hybridisiert. Es bedeuten: M, 100 bp Marker (MBI-Fermentas).

Bei der Auswertung des Autoradiogramms wurde nach Banden gesucht, deren Größe bei der Repression von *Srp2* zugenommen hat. Bei diesen Banden könnte es sich um PCR-Produkte von mRNAs handeln, die nicht mehr oder nur noch unvollständig gespleißt wurden, d. h. noch ein oder mehrere Introns enthalten.

In den PCR-Produkten der Primerpaar-Kombinationen 3C, 3G und 5G wurden drei „shifts“ gefunden, die sich nach Wiederholung der PCR-Reaktionen reproduzieren ließen. Das Autoradiogramm dieser PCR-Produkte zeigt die Abbildung 3.30.

Die Banden wurden aus dem Polyacrylamidgel ausgeschnitten und mit den entsprechenden Primerpaar-Kombinationen reamplifiziert. Die PCR-Produkte wurden anschließend in einem Agarosegel aufgetrennt. Es wurden Banden mit einer Größe von 150 bis 300 bp erhalten (Abb.3.31-A). Die Größendifferenz der Banden aus den PCR-Reaktionen mit und ohne Thiamin reicht von 50 bis 100 bp. *S.pombe* Introns haben eine durchschnittliche Größe von 40 bis 120 bp (Prabhala *et al.*, 1992). Folglich könnte es sich bei den markierten Banden in den Spuren 3C+, 3G+ und 5C+ um PCR-Produkte unvollständig gespleißter mRNAs handeln.

Um zu testen, ob diese Banden aus den gleichen Transkripten hervorgegangen sind, wurde eine Southern-Hybridisierung durchgeführt. Dazu wurden die reamplifizierten PCR-Produkte auf eine Nylonmembran übertragen und mit den radioaktiv markierten PCR-Produkten 3C+, 3G+ und 5G+ hybridisiert.

Wie aus dem Autoradiogramm in der Abb.3.31-B hervorgeht, hybridisieren die Sonden nicht mit den PCR-Produkten 3C-, 3G- und 5G-. Folglich sind diese PCR-Produkte nicht aus denselben Transkripten hervorgegangen.

Dies kann verschiedene Ursachen haben: Einerseits besteht die Möglichkeit, daß es sich bei den beobachteten „shifts“ um PCR-Produkte von mRNAs handeln könnte, die eine Funktion im Thiaminstoffwechsel haben, d. h. durch den *nmt* Promotor reguliert werden, so daß sie in An- bzw. Abwesenheit von Thiamin unterschiedlich stark exprimiert werden. Andererseits besteht die Möglichkeit, daß die verwendete Primerpaar-Kombinationen ungeeignet sind, um die von *Srp2* abhängig gespleißten prä-mRNAs zu isolieren. Um zu untersuchen, welche dieser Möglichkeiten zutreffen, sind jedoch weitere Experimente erforderlich.

3.9 Das Exon 6 von *srp2* enthält eine mögliche Splicing Enhancer Sequenz

Bei der näheren Untersuchung der Sequenz des *srp2* Gens ist in Exon 6 eine kurze purinreiche Sequenz (GAAAGAAGAAGAGAGAA) aufgefallen, die große Ähnlichkeit mit der Sequenz von Splicing Enhancer Elementen aus dem Menschen hat. Als Splicing Enhancer werden Sequenzelemente einer prä-mRNA bezeichnet, die das Spleißen von benachbarten Introns aktivieren oder fördern können. Sie bestehen in der Regel aus kurzen purinreichen Sequenzen, in denen oft die Nukleotidabfolge GAR (R = G oder A) in mehrfacher Wiederholung gefunden wird (Graveley *et al.*, 1998). Dieses Sequenzmotiv ist auch in der purinreichen Sequenz von *srp2* enthalten.

Splicing Enhancer Elemente treten häufig in der Nähe von solchen Introns oder Exons auf, die alternativ gespleißt werden, oder deren Spleißstellen von der Konsensussequenz abweichen.

Wie die Abb.3.32 zeigt, wird die Erkennung dieser Spleißstellen durch die Bindung von SR-Proteinen an die Splicing Enhancer Elemente ermöglicht. Man stellt sich vor, daß die an der Enhancer Sequenz gebundenen SR-Proteine mit den snRNPs interagieren und so den Kontakt zwischen der Spleißstelle und dem Spleißosom herstellen. Die Spleißstelle kann daraufhin vom Spleißosom erkannt und für die Spleißreaktion verwendet werden.

Auf diese Weise können die Splicing Enhancer Elemente das Spleißen von Exons oder Introns über eine Distanz von bis zu 500 Nukleotiden beeinflussen (Schaal & Maniatis, 1999). Das alternative Spleißen wird wahrscheinlich durch die sequenzspezifische Bindung

der SR-Proteine an bestimmte Splicing Enhancer Elemente reguliert.

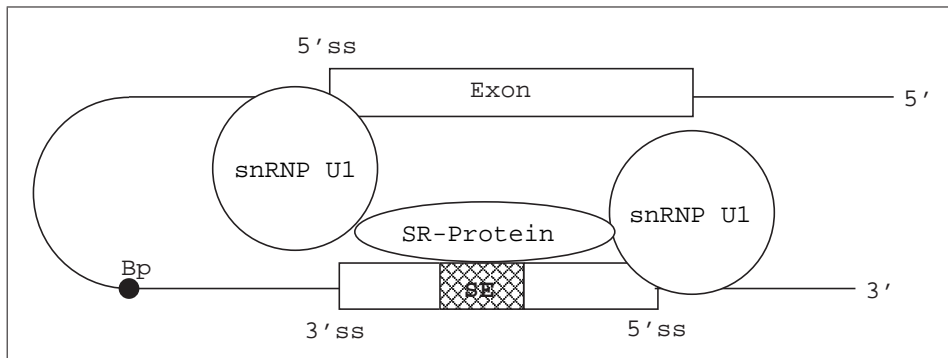


Abb. 3.32: Schema der Funktion eines Splicing Enhancer Elements beim konstitutiven und alternativen Spleißen von prä-mRNA. Das SR-Protein bindet an das Splicing Enhancer Element und tritt dabei mit dem snRNP U1 in Kontakt, das an die 5'-Spleißstellen der benachbarten Introns bindet.

Die purinreiche Sequenz in Exon 6 ist ein Hinweis dafür, daß die *srp2* prä-mRNA alternativ gespleißt werden könnte.

Srp2 hat große Ähnlichkeit mit den SR-Proteinen aus dem Menschen. Von den SR-Proteinen SRp20, SRp40 und Srp55 wurden bereits alternativ gespleißte mRNAs gefunden (Jumaa & Nielsen, 1997, Srean et al., 1995). Diese kodieren für verkürzte Formen der SR-Proteine, die nur noch aus der ersten RNA-Bindungsdomäne bestehen. Ein Beispiel dafür ist das SR-Protein SRp40: Es hat zwei RNA-Bindungsdomänen und eine RS-Domäne und wird von einem Gen kodiert, das aus 8 Exons und 7 Introns besteht.

Eine der alternativ gespleißten Formen dieses Gens entsteht dadurch, daß das Intron 5 nicht aus der mRNA herausgespleißt wird. Dieses Intron enthält in allen drei Leserastern mehrere Stopcodons. Durch den Verbleib dieses Introns in der mRNA wird das offene Leseraster so unterbrochen, daß nur noch die erste RNA-Bindungsdomäne von SRp40 translatiert werden kann (Du & Taub, 1997). Weil sich zwischen der ersten und zweiten RNA-Bindungsdomäne von *srp2* ebenfalls ein Intron befindet, ist es denkbar, daß dieses Gen auf eine ähnliche Art und Weise gespleißt werden könnte.

Um zu untersuchen, ob es von der *srp2* mRNA alternativ gespleißte Formen gibt wurde eine RT-PCR durchgeführt. Die RT-PCR ermöglicht den direkten und spezifischen Nachweis der mRNAs einer Zelle. Dazu wird die mRNA zunächst revers transkribiert (RT) und die dabei entstehende cDNA mit Hilfe einer darauffolgenden PCR-Reaktion amplifiziert.

Für die RT-PCR wurden zwei 3'-spezifische Primer synthetisiert: Der Primer A bindet im Intron 6, das der ersten RNA-Bindungsdomäne von *srp2* folgt (Abb.3.33). Der Primer B bindet im Exon 10 von *srp2* (Abb.3.33). Als 5'-spezifischer Primer wurde ein Oligonukleotid verwendet, das am Beginn von Exon 1 bindet (Abb.3.33; 5'-Primer).

Wenn es von der *srp2* mRNA alternativ gespleißte Formen gibt, dann könnten diese mit den Primern A und B nachgewiesen werden: Die konstitutiv gespleißte Form der *srp2* mRNA würde mit dem Primer B ein PCR-Produkt von ca. 550 bp liefern. PCR-Produkte, die sich von alternativ gespleißten Formen der *srp2* mRNA ableiten, könnten entweder kleiner oder größer als 550 bp sein, je nachdem, auf welche Weise die *srp2* prä-mRNA gespleißt wird. So könnten z. B. verschiedene Exons miteinander kombiniert werden, oder, wie beim alternativen Spleißen der SR-Proteine aus dem Menschen, bestimmte Introns in der mRNA verbleiben.

Eine solche mRNA kann mit dem Primer A amplifiziert werden: Wenn aus der *srp2* mRNA z. B. alle Introns bis auf das Intron 6 entfernt sind, würde man mit diesem Primer ein PCR-Produkt von ca. 320 bp erhalten. PCR-Produkte, die größer als 320 bp sind, könnten noch weitere Introns oder Exons enthalten. So würde z. B. die *srp2* prä-mRNA mit diesem Primer ein PCR-Produkt von ca. 600 bp liefern.

3 Ergebnisse

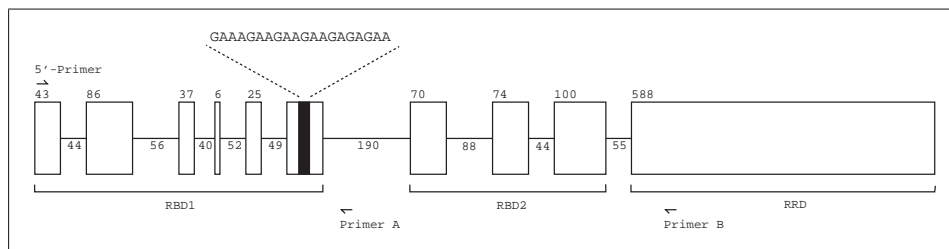


Abb. 3.33: Primer für den Nachweis der *srp2* (prä-)mRNA in *S.pombe* Zellen. Es wurden zwei 3' spezifische Primer hergestellt. Der Primer A bindet im Intron 6, der Primer B im Exon 10 von *srp2*. Als 5' spezifischer Primer wurde eine Oligonukleotid verwendet, daß im Exon 1 bindet. Introns sind als Linien, Exons als Rechtecke gezeichnet. Die Länge der Exons und Introns ist in Basenpaaren angegeben. Die Exons 1 bis 6 kodieren die erste, die Exons 7, 8 und 9 die zweite RNA-Bindungsdomäne von *Srp2*. Die carboxyterminale argininreiche Domäne wird vom Exon 10 kodiert.

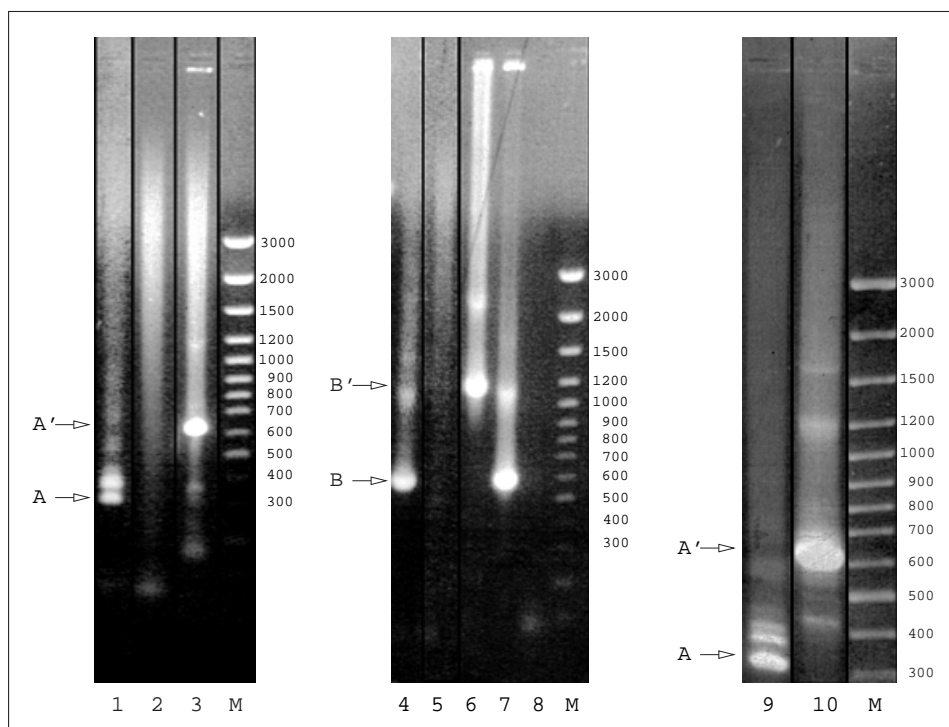


Abb. 3.34: Produkte der RT-PCR-Reaktionen. In den Spuren 1–10 sind die PCR-Produkte aus den folgenden Reaktionen aufgetragen: (1) mRNA mit Primer A. (2) mRNA mit Primer A, ohne RT-Reaktion. (3) Genomisches *srp2* Fragment mit Primer A. (4) mRNA mit Primer B. (5) mRNA mit Primer B, ohne RT-Reaktion. (6) Genomisches *srp2* Fragment mit Primer B. (7) *srp2* cDNA mit Primer B. (8) Primer B ohne RNA/DNA, Kontrolle. (9) mRNA mit Primer A. (10) Genomisches *srp2* Fragment mit Primer A. (M) Marker, 100 bp Leiter (MBI-Fermentas). Die Größe der Banden ist jeweils angegeben. In allen PCR-Reaktionen wurde der 5'-spezifische Primer verwendet, der im Exon 1 bindet. Die Pfeile markieren die Größe der PCR-Produkte, die mit den Primern A und B, mit mRNA (A und B) oder mit prä-mRNA (A' und B') zu erwarten sind.

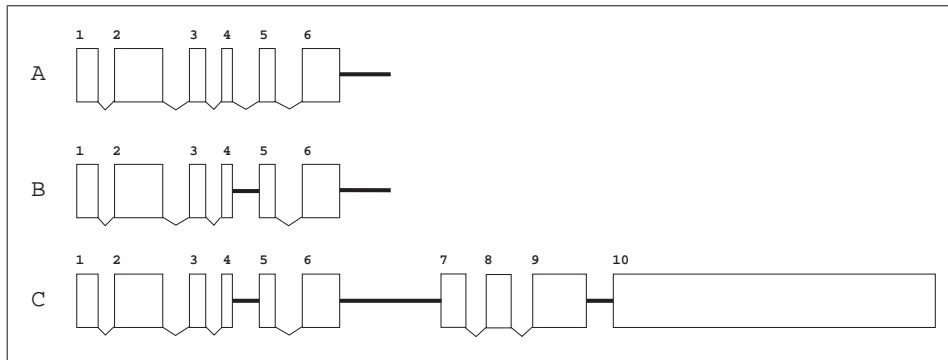


Abb. 3.35: Schematische Darstellung der isolierten *srp2* cDNAs, die ein oder mehrere Introns enthalten. Nicht aus der *srp2* mRNA herausgespleißte Introns sind durch fett gedruckte Linien eingezeichnet. (A) 320 bp großes PCR-Produkt aus der *S.pombe* cDNA Bank. (B) 350 bp großes PCR-Produkt aus der *S.pombe* cDNA Bank. (C) 1.500 bp große *srp2* cDNA die bei der Koloniehybridisierung isoliert wurde.

Die RT-PCR wurde mit mRNA durchgeführt, die aus einem *S.pombe* Wildtyp Stamm (L972) isoliert wurde. Die Produkte der PCR-Reaktionen wurden in einem Agarosegel aufgetrennt und sind in der Abbildung 3.34 gezeigt.

Um zu überprüfen, ob die verwendete mRNA frei von chromosomaler *S.pombe* DNA ist, wurde bei den PCR-Reaktionen in Spur 2 und 5 keine reverse Transkription durchgeführt. Zum Größenvergleich wurden PCR-Produkte aufgetragen, die mit den Primern A und B aus einem genomischen *srp2* Fragment (Abb.3.34; Spuren 3, 6 und 10) und der *srp2* cDNA amplifiziert wurden (Abb.3.34; Spur 7).

Mit dem Primer B wurde eine Bande mit einer Größe von 550 bp erhalten (Abb.3.34; Spur 4, B). Es ist wahrscheinlich ein PCR-Produkt der konstitutiv gespleißten Form der *srp2* mRNA, denn es hat dieselbe Größe wie das PCR-Produkt, das mit der *srp2* cDNA und dem Primer B erhalten wurde (Abb.3.34; Spur 7, B).

Desweiteren wurde ein PCR-Produkt mit einer Größe von etwa 1.200 bp erhalten. Es ist in der Abb.3.34 in Spur 4 (B') als schwache Bande zu erkennen. Es könnte ein PCR-Produkt der *srp2* prä-mRNA sein, denn es hat dieselbe Größe wie das PCR-Produkt, das aus dem genomischen *srp2* Fragment mit Hilfe des Primers B amplifiziert wurde (Abb.3.34; Spur 6, B').

Mit dem Primer A wurden drei verschiedene PCR-Produkte erhalten: Sie haben eine Größe von etwa 320, 350 und 400 bp (Abb.3.34; Spur 1, A). Um die Banden besser darstellen zu können, wurden diese PCR-Produkte in einem höherprozentigen Agarosegel aufgetrennt (Abb.3.34; Spur 9, A). Aufgrund ihrer Größe könnte die 320 bp große Bande das PCR-Produkt einer *srp2* mRNA sein, aus der sämtliche Introns, bis auf das Intron 6, herausgespleißt sind. Die 350 bp und 400 bp großen PCR-Produkte könnten außer dem Intron 6 noch weitere Introns oder Exons enthalten.

Um zu untersuchen, welche Introns und Exons in diesen PCR-Produkten enthalten sind, wurden die PCR-Reaktionen mit dem Primer A und einer *S.pombe* cDNA Bank wiederholt (Schmidt, 1998). Es wurden drei PCR-Produkte mit einer Größe von 320, 350 und 400 bp erhalten. Das 320 und 350 bp große PCR-Produkt konnte in den Vektor pUC19 ligiert und sequenziert werden. Die Sequenzierung ergab, daß das 320 bp große Produkt das Intron 6 (Abb.3.35; A) und das 350 bp große Produkt die Introns 4 und 6 enthält (Abb.3.35; B). Desweiteren wurde eine Koloniehybridisierung mit einer *S.pombe* cDNA Bank durchgeführt (Schmidt, 1998). Dabei wurde das Intron 6 aus dem *srp2* Gen als Sonde verwendet. Es wurde eine cDNA des *srp2* Gens mit einer Größe von 1.500 bp isoliert. Die Sequenzierung ergab, daß aus dieser cDNA die Introns 4, 6 und 9 nicht herausgespleißt waren (Abb.3.35; C).

Diese Ergebnisse zeigen, daß in *S.pombe* Zellen unvollständig gespleißte *srp2* mRNAs vorkommen, aus denen die Introns 4, 6 und 9 nicht herausgespleißt sind. Alternativ gespleißte Formen der *srp2* mRNA, die aus Kombinationen verschiedener Exons bestehen, wurden nicht gefunden.

Es ist auffällig, daß die unvollständig gespleißten mRNAs nur mit dem Primer A, der im Intron 6 bindet, aber nicht mit dem Primer B, der im Exon 10 bindet, nachgewiesen werden konnten. Das könnte bedeuten, daß die *srp2* mRNA in einer viel größeren Konzentration in den *S.pombe* Zellen vorkommt, als die unvollständig gespleißten *srp2* mRNAs und deshalb besser amplifiziert wird.

Die Reihenfolge mit der die Introns aus einer prä-mRNA herausgespleißt werden, ist nicht festgelegt. Weil die Polyadenylierung des 3'-Endes der prä-mRNA dem Spleißen vorausgeht, ist es möglich, daß auch unvollständig gespleißte mRNAs in eine mRNA Präparation oder eine cDNA Bank gelangen können.

Deshalb könnte die Isolierung der unvollständig gespleißten *srp2* mRNAs entweder zufällig geschehen, oder dadurch bedingt sein, daß die Introns 4, 6 und 9 schlechter aus der *srp2* prä-mRNA herausgespleißt werden, als die anderen Introns von *srp2*.

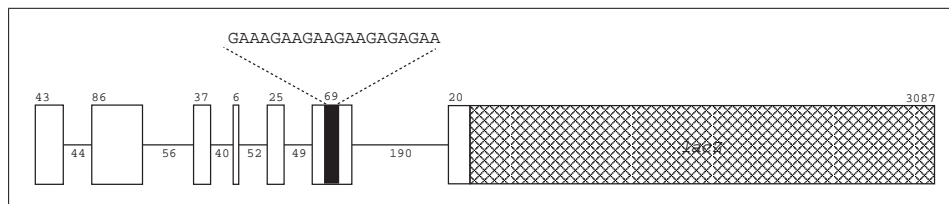


Abb. 3.36: Schematische Darstellung der Fusion des *srp2* Gens mit dem *lacZ* Gen aus *E.coli*. Exons sind als Rechtecke, Introns sind als Linien gezeichnet. Die Position und die Sequenz des möglichen Splicing Enhancers in Exon 6 ist angegeben. Für die Fusion wurde nur ein Teil des *srp2* Gens verwendet, bestehend aus den Exons/Introns 1–6 und einem Teil des Exons 7. Die Länge der Introns und Exons ist in Basenpaaren angegeben.

Falls die purinreiche Sequenz in Exon 6 das Herausspleißen dieser Introns fördert oder reguliert, dann könnte sich die Deletion dieser Sequenz auf das Spleißen von *srp2* auswirken. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurde ein Teil des *srp2* Gens mit dem *lacZ* Gen von *E.coli* fusioniert (s. Material und Methoden, S.33).

Wenn ein oder mehrere Introns aus dem Transkript dieses Konstrukts nicht herausgespleißt werden, würden im offenen Leseraster Stopcodons entstehen. Dadurch kann das *lacZ* Gen nicht mehr translatiert werden. Das würde zu einer verringerten β -Galaktosidase-Aktivität führen. Um zu untersuchen, ob die purinreiche Sequenz das Spleißen von *srp2* beeinflusst, wurde ein Konstrukt hergestellt, aus dem diese Sequenz vollständig deletiert wurde (Abb.3.36).

Die Konstrukte wurden in den *S.pombe* Expressionsvektor pRIP2 ligiert und in das Genom des *S.pombe* Stamms AG8 integriert, damit sie nur in einer Kopie pro Zelle vorliegen. Aus den Transformanten wurden Gesamt-Proteinextrakte hergestellt und die β -Galaktosidase-Aktivität gemessen (Abb.3.37).

Im Extrakt der Zellen, die mit dem Konstrukt transformiert waren, das den möglichen Splicing Enhancer enthält, wurde eine Aktivität von 404 ± 81 Units gemessen. Bei der Deletion der purinreichen Sequenz wurden eine Aktivität von 567 ± 105 Units bestimmt. Als Kontrolle wurde nur das *lacZ* Gen in die Zellen transformiert. Im Proteinextrakt dieser Transformanten wurde eine Aktivität von 2950 ± 758 Units gemessen. In nicht-transformierten Zellen konnte keine β -Galaktosidase-Aktivität nachgewiesen werden.

Aufgrund dieser Ergebnisse ist es nicht möglich zu entscheiden, ob das Spleißen von *srp2* von der purinreichen Sequenz beeinflusst wird, weil die Differenz zwischen den Meßwerten zu gering ist und innerhalb der Standardabweichung liegt.

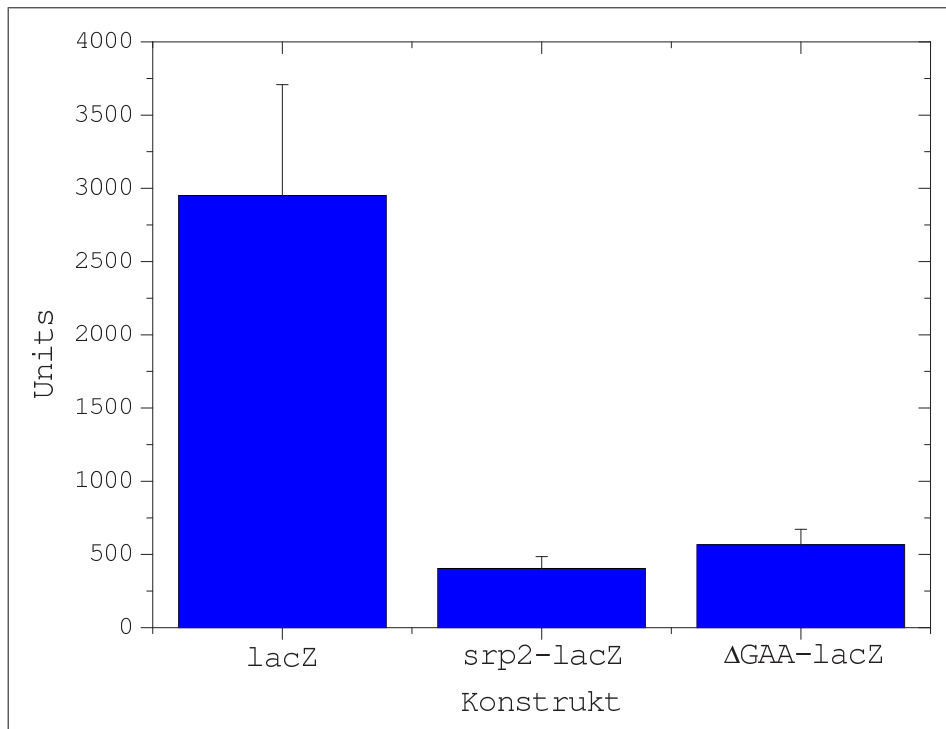


Abb. 3.37: Messung der β -Galaktosidase Aktivität der Fusionskonstrukte vor (*srp2-lacZ*) und nach der Deletion (*srp2-ΔGAA*) der purinreichen Sequenz. Als Kontrolle wurde das *lacZ* Gen von *E.coli* verwendet. Es wurde die β -Galaktosidase Aktivität im Gesamt-Protein Extrakt der transformierten *S.pombe* Zellen gemessen. Die Aktivität wurde mit der Gleichung von [Guarente \(1991\)](#) bestimmt und ist in „Miller-Units“ angegeben.

Es bleibt daher ungewiß, ob diese Sequenz in *S.pombe* als Splicing-Enhancer wirken kann und das Spleißen der Introns von *srp2* reguliert. Es gibt jedoch Hinweise, daß diese Sequenz *in vitro* als Splicing Enhancer wirken kann (s. Diskussion).

4 Diskussion

Die SR-Proteine der höheren Eukaryonten gehören zu einer Familie von Spleißfaktoren, die für das konstitutive und alternative Spleißen von prä-mRNA essentiell sind. Ihre Aufgabe besteht darin, den Spleißapparat bei der Erkennung der Spleißstellen zu unterstützen und die Auswahl von alternativen Spleißstellen zu regulieren.

Bisher wurden die SR-Proteine hauptsächlich *in vitro* untersucht, so daß derzeit nur sehr wenig Daten über ihre Funktion *in vivo* vorliegen. Die Isolierung des *srp1* Gens hat gezeigt, daß auch die Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe* SR-Proteine besitzt und zum Spleißen von prä-mRNA verwendet (Gross *et al.*, 1997). Diese Arbeit hatte das Ziel weitere SR-Proteine aus der Spalthefe zu isolieren, um deren Funktion *in vivo* zu charakterisieren.

4.1 Die Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe* besitzt ein weiteres SR-Protein

Aus einer cDNA Bank wurde eine cDNA isoliert, deren offenes Leseraster für ein Protein von 365 Aminosäuren kodiert. Es besteht aus zwei aminoterminalen RNA-bindenden und einer carboxyterminalen argininreichen Domäne. Die RNA-Bindungsdomänen enthalten die Sequenzmotive RNP-1 und RNP-2, die ein charakteristisches Merkmal von RNA-bindenden Proteinen sind. Weiterhin besitzt es die typischen Signatursequenzen der SR-Proteine: In der ersten RNA-Bindungsdomäne folgt die Sequenz DARDAR auf das RNP-1 Motiv, und in der zweiten RNA-Bindungsdomäne kommt die Signatursequenz SWQDLKD vor.

Sowohl die Sequenz, als auch die Anordnung der verschiedenen Domänen spricht dafür, daß dieses Protein zur Familie der SR-Proteine gehört: Bis zu 51 % der Aminosäuren der RNA-Bindungsdomänen sind mit den Sequenzen der SR-Proteine aus dem Menschen identisch. Ein besonders deutlicher Hinweis dafür ist die Signatursequenz SWQDLKD der zweiten RNA-Bindungsdomäne, die bisher in keinen anderen RNA-bindenden Proteinen als den SR-Proteinen gefunden wurde. Des weiteren beginnt die carboxyterminale Domäne dieses Proteins an der gleichen Position, wie die SR-Domänen der SR-Proteine aus dem Menschen. Damit ist Srp2 das zweite Protein der Spalthefe, das zur Familie der SR-Proteine gehört.

4.2 Welche Funktion haben die einzelnen Domänen von Srp2 *in vivo*?

Durch die Fusion mit dem Green Fluorescent Protein, die Überexpression und die Komplementierung des konditional letalen *srp2* Stamms wurde die Funktion der verschiedenen Domänen von Srp2 untersucht:

Bei der Überexpression der ersten RNA-Bindungsdomäne von Srp2 wurde festgestellt, daß dadurch das Wachstum der *S.pombe* Zellen gehemmt wird, es dabei aber nicht zu einer Akkumulation von *tfl1d* prä-mRNA kommt, wie es bei der Überexpression der RNA-Bindungsdomäne von Srp1 beobachtet wurde. Das läßt darauf schließen, daß sich die Funktion der ersten RNA-Bindungsdomäne von Srp2 und der RNA-Bindungsdomäne von Srp1 unterscheidet.

Allerdings wurde durch die Komplementierung des konditional letalen *srp2* Stamms gezeigt, daß die RNA-Bindungsdomäne von Srp1 in der Lage ist, die Funktion der ersten RNA-Bindungsdomäne von Srp2 zu ersetzen. Der konditional letale Stamm konnte jedoch nicht von der *srp1* cDNA komplementiert werden.

Die Fusion mit der zweiten RNA-Bindungsdomäne von Srp2 hat außerdem die Folge, daß der dominant negative Effekt aufgehoben wird, den die erste RNA-Bindungsdomäne von Srp1 bei der Überexpression auf das Wachstum der *S.pombe* Zellen und das Spleißen von *tflld* prä-mRNA ausübt. Diese Ergebnisse erscheinen zunächst widersprüchlich, lassen sich aber anhand der besonderen Struktur der RNA-Bindungsdomänen erklären:

Vergleichende Untersuchungen der Sequenzen von über 100 verschiedenen RNA-bindenden Proteinen haben ergeben, daß die RNA-Bindungsdomänen dieser Proteine eine sehr ähnliche Sekundärstruktur besitzen (Birney *et al.*, 1993). Dies konnte durch die Untersuchung von verschiedenen RNA-bindenden Proteinen mit Hilfe der Röntgenkristallographie bestätigt werden.

Bisher liegen Daten über die Struktur des SXL Proteins von *Drosophila*, des spezifisch am Spleißosom gebundenen Proteins U1A und des hnRNP A1 Proteins aus dem Menschen vor (Handa *et al.*, 1999). Zwar sind dies keine SR-Proteine, dennoch gibt ihre Sekundärstruktur Auskunft darüber auf welche Art und Weise die RNA von den RNA-Bindungsdomänen gebunden wird:

Die Abb.4.1 zeigt ein Modell der Sekundärstruktur der RNA-Bindungsdomänen des SXL Proteins (*sex lethal*) von *Drosophila*. SXL besteht aus 354 Aminosäuren und hat zwei RNA-Bindungsdomänen, die eine Länge von insgesamt 180 Aminosäuren besitzen. *In vivo* reguliert SXL das alternative Spleißen der *transformer* prä-mRNA, indem es an eine pyrimidinreiche Region bindet (GUUGUUUUUUU), die sich am Ende des ersten Introns dieser prä-mRNA befindet (s. Einleitung, Abb.1.3, S.5).

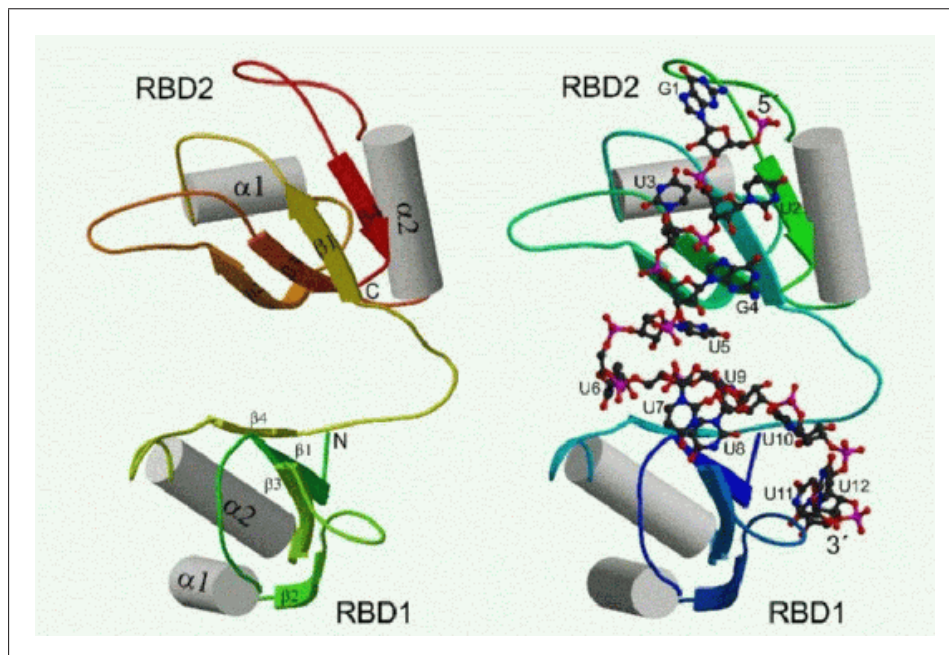


Abb. 4.1: Sekundärstruktur der RNA-Bindungsdomänen des SXL Proteins von *Drosophila*. Links: Struktur der RNA-Bindungsdomänen ohne RNA. Der N- und C-Terminus, sowie die α -Helices und die β -Faltblattstrukturen der RNA-Bindungsdomänen (RBD1 und RBD2) sind markiert. Rechts: Komplex zwischen dem SXL Protein und einem 12 nt langen RNA-Molekül, dessen Sequenz (GUUGUUUUUUU) aus der pyrimidinreichen Region der (*transformer*) prä-mRNA abgeleitet wurde. Das RNA-Molekül ist als „ball-and-stick“ Modell eingezeichnet. Das 5'- und 3'-Ende der RNA ist markiert. Die 3D-Struktur wurde aus dem Eintrag 1B7F der Brookhaven PDB-Datenbank¹ mit Hilfe der Programme Molscript V2.0.2² und Raster3D V2.4j³ berechnet (Kraulis, 1991, Merritt & Bacon, 1997).

Wie aus der Abb.4.1 hervorgeht, haben beide RNA-Bindungsdomänen des SXL Proteins die gleiche Sekundärstruktur. Sie sind aus vier antiparallelen β -Faltblattstrukturen aufgebaut, die in der Reihenfolge $\beta_1\alpha_1\beta_2\beta_3\alpha_2\beta_4$ angeordnet sind. Die RNA wird von den β -Faltblattstrukturen β_1 und β_3 gebunden, die vom RNP-2 und RNP-1 Motiv gebildet werden. Beide sind in einer Ebene angeordnet und bilden eine Art „Plattform“, die den Kontakt mit der RNA herstellt (Handa *et al.*, 1999).

Die RNA-Bindungsdomänen sind durch einen flexiblen Bereich aus ca. 10 Aminosäuren miteinander verbunden, wodurch die β -Faltblattstrukturen der beiden Domänen einen V-förmigen „Spalt“ bilden. Durch diese flexible Verbindung können die RNA-Bindungsdomänen nahezu wie voneinander getrennte Protein-Untereinheiten an die RNA binden.

Bei der Bindung durch SXL wird von der RNA keine besondere Sekundärstruktur gebildet, wie z. B. in Form einer Haarnadelschleife. Die SR-Proteine aus dem Menschen haben ebenfalls Bindungsstellen die nicht länger als 6-10 Nukleotide sind. Auch hier gibt es keinerlei Hinweise, daß die RNA dabei eine besondere Sekundärstruktur einnimmt (Tacke & Manley, 1999).

Dadurch wird die Bindung der RNA-Bindungsdomänen an verschiedene, aber benachbarte Nukleotide des RNA-Moleküls möglich. Während die zweite RNA-Bindungsdomäne von SXL hauptsächlich an die Nukleotide U₃, G₄ und U₅ bindet, werden die folgenden sechs Nukleotide (U₆U₇U₈U₉U₁₀U₁₁) von der ersten RNA-Bindungsdomäne gebunden.

Das erklärt einerseits, weshalb die RNA-Bindungsdomänen auch getrennt voneinander an RNA binden können und zeigt andererseits, daß sich durch die Kombination von zwei verschiedenen RNA-Bindungsdomänen die Spezifität eines RNA-bindenden Proteins erheblich ändern kann. Dies wurde z. B. beim Spleißfaktor ASF/SF2 beobachtet. Voneinander getrennt und in Kombination binden die beiden RNA-Bindungsdomänen *in vitro* an vollkommen verschiedene RNA Sequenzen (Tacke & Manley, 1995).

Die Ergebnisse der Überexpression von Srp2 und die Komplementierung des konditional letalen Stamms deuten darauf hin, daß auch die RNA-Bindungsdomänen von Srp2 auf ähnliche Art und Weise an die RNA binden könnten: Bei der Überexpression der RNA-Bindungsdomänen wird vermutlich deshalb das Wachstum der *S.pombe* Zellen gehemmt, weil die RNA-Bindungsdomänen auch getrennt voneinander an RNA binden können. Da diese Versuche in *S.pombe* Stämmen durchgeführt wurden, die das *srp1* und *srp2* Wildtyp Gen besitzen, ist es denkbar, daß Srp1⁺ und Srp2⁺ mit den überexprimierten Proteinen um ihre RNA-Bindungsstellen konkurrieren und so an ihrer Funktion gehindert werden.

Da nur bei der Überexpression der RNA-Bindungsdomäne von Srp1 eine Akkumulation von *tfIIId* prä-mRNA beobachtet wurde, ist anzunehmen, daß sich die Bindungsspezifität der RNA-Bindungsdomäne von Srp1 und der ersten RNA-Bindungsdomäne von Srp2 unterscheidet. Doch durch die Kombination der RNA-Bindungsdomäne von Srp1 mit der zweiten RNA-Bindungsdomäne und der carboxyterminalen Domäne von Srp2 entsteht ein Protein, daß die gleichen RNA-bindenden Eigenschaften wie Srp2 hat.

Deshalb kommt es bei der Überexpression dieses Fusionsproteins nicht mehr zu einer Akkumulation von *tfIIId* prä-mRNA. Außerdem wird es dadurch möglich, den konditional letalen *srp2* Stamm zu komplementieren. Das zeigt einerseits, daß beide RNA-Bindungsdomänen über die RNA-Bindungsspezifität entscheiden können und bedeutet andererseits, daß die Spezifität von Srp2 hauptsächlich von der zweiten RNA-Bindungsdomäne bestimmt wird.

Dies wurde auch bei den SR-Proteinen aus dem Menschen beobachtet: Zum Beispiel wurde die Substratspezifität des SR-Protein ASF/SF2 beim konstitutiven und alternativen Spleißen *in vitro* nicht verändert, wenn die erste RNA-Bindungsdomäne von ASF/SF2 gegen die RNA-Bindungsdomäne des Spleißfaktors SC35 ausgetauscht wurde. Obwohl die RNA-Bindungsdomänen von ASF/SF2 und SC35 *in vitro* an vollkommen verschiedene Konsensussequenzen binden (Mayeda *et al.*, 1999).

¹<http://www.rcsb.org/pdb/>

²<http://www.avatar.se/molscript/>

³<http://www.bmsc.washington.edu/raster3d/raster3d.html>

Die Signatursequenzen der RNA-Bindungsdomänen sind in allen SR-Proteinen konserviert. Durch die Mutagenese der Signatursequenzen der ersten und zweiten RNA-Bindungsdomäne wurde untersucht, welche Bedeutung diese Sequenzen für die Funktion von Srp2 *in vivo* haben. Dabei zeigte sich, daß die Signatursequenz der ersten RNA-Bindungsdomäne (DARDAR) nicht für die Funktion von Srp2 erforderlich ist.

Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit Untersuchungen, die an dem SR-Protein ASF/SF2 durchgeführt wurden: Nach der Mutagenese der Sequenz DPRDAE, die sich an der gleichen Position wie die Signatursequenz von Srp2 befindet (s. Abb.3.1, S.39), konnten *in vitro* keine Auswirkungen auf das konstitutive und alternativ Spleißen festgestellt werden. Erst durch die Mutagenese der aromatischen Aminosäuren im RNP-1 Motiv, die an der Bindung der RNA beteiligt sind, zeigte ASF/SF2 in HeLa S100 Extrakten keine Spleißaktivität mehr (Caceres & Krainer, 1993).

Wenn die Signatursequenz der zweiten RNA-Bindungsdomäne mutiert wurde, dann konnte Srp2 den konditional letalen Stamm nicht mehr komplementieren. Die Überexpression des mutierten Proteins führte zur Hemmung des Wachstums der *S.pombe* Zellen. Folglich zerstört diese Mutation die Funktion der zweiten RNA-Bindungsdomäne. Das zeigt erstmalig, daß dieses hochkonservierte Sequenzmotiv *in vivo* essentiell für die Funktion der SR-Proteine ist.

Dennoch bleibt die Funktion dieser beiden Signatursequenzen unklar. Auch hier gibt die Sekundärstruktur der RNA-Bindungsdomänen von SXL einen Hinweis auf die mögliche Funktion: Sofern sich die Sekundärstruktur von SXL auf die RNA-Bindungsdomänen von Srp2 übertragen läßt, würde das Sequenzmotiv SWQDLKD in der Helix α_1 (s. Abb.4.1) der zweiten RNA-Bindungsdomäne liegen und der RNA abgewandt sein. Dies macht es unwahrscheinlich, daß diese Signatursequenz für die direkte Bindung der RNA benötigt wird. Das gleiche gilt für die Sequenz DARDAR, die sich in der Helix α_2 der ersten RNA-Bindungsdomäne befindet.

Vielleicht werden diese beiden Helices für die Protein-Protein Interaktion mit weiteren Komponenten des Spleißosoms benötigt. Weil diese Signatursequenzen in allen SR-Proteinen vorhanden sind, wäre es möglich, daß sie für die Interaktion mit einem spezifisch am Spleißosom gebundenen Protein erforderlich sind, denn diese Proteine sind in höheren wie niederen Eukaryonten sehr gut konserviert (Kraemer, 1996).

Eine Voraussetzung dafür ist, daß diese Helices an der Oberfläche der SR-Proteine liegen. Dies ist jedoch nicht bekannt, weil bisher noch kein SR-Protein kristallisiert wurde.

Die carboxyterminalen Domänen der SR-Proteine aus dem Menschen erfüllen mehrere Aufgaben: Einerseits sind die SR-Domänen für die Interaktion mit anderen SR-Proteinen und Spleißfaktoren erforderlich, andererseits werden diese Domänen für die nukleäre und subnukleäre Lokalisation der SR-Proteine benötigt (Caceres *et al.*, 1997).

Durch die Fusion mit dem Green Fluorescent Protein wurde gezeigt, daß auch Srp2 ein Kernprotein ist und die carboxyterminale Domäne die Aufgabe hat, für den Transport von Srp2 in den Zellkern zu sorgen. Am Beginn und am Ende dieser Domäne von Srp2 befinden sich zwei kurze SR-Dipeptid Elemente, in denen insgesamt 6 SR-Dipeptide vorkommen.

Das unterscheidet Srp2 von einem typischen SR-Protein, denn in der carboxyterminalen Domäne der SR-Proteine aus dem Menschen sind in der Regel mehr SR-Dipeptide vorhanden. Es gibt aber auch beim Menschen SR-Proteine, die nur wenige SR-Dipeptide enthalten, wie z. B. das SR-Protein SRp30c, das nur 5 SR-Dipeptide besitzt (Screaton *et al.*, 1995).

Durch die Mutagenese der *srp2* cDNA wurde gezeigt, daß die beiden SR-Dipeptid Elemente eine Funktion als Kerntransportsignal besitzen. Bereits eines der beiden SR-Elemente reicht aus, um Srp2 in den Zellkern zu transportieren. Diese Domäne enthält keines der bekannten Kerntransportsignale wie z. B. ein NLS vom Nukleoplasmin- oder SV40-Typ (Dingwall, 1991, Dingwall & Laskey, 1991).

In HeLa Zellen wurde ein Protein identifiziert, daß für den Import von SR-Proteinen in den Zellkern verantwortlich ist (Kataoka *et al.*, 1999): Es wird Transportin-SR genannt und kann spezifisch an die SR-Dipeptide der Spleißfaktoren ASF/SF2 und SC35 binden (Kataoka *et al.*, 1999). Transportin-SR gehört zu einer Gruppe von Proteinen, die als β -Importine bezeichnet werden. Diese Proteine sorgen für die Erkennung der Kerntransportsignale von Kernproteinen während des Transports durch den Kernporenkomplex (Nakielnny *et al.*, 1996).

In *S.pombe* wurde ein mögliches Homolog von Transportin-SR gefunden (Kataoka *et al.*, 1999). Dies deutet darauf hin, daß der Transport von SR-Proteinen in den Zellkern in höheren wie niederen Eukaryonten auf ähnliche Weise reguliert wird. Durch die Identifizierung der SR-Elemente als Kerntransportsignal von Srp2 eröffnet sich die Möglichkeit, den Transport der SR-Proteine in den Zellkern *in vivo* näher zu charakterisieren.

Wie bereits erwähnt, dient die carboxyterminale Domäne der SR-Proteine auch zur Interaktion mit anderen SR-Proteinen und Spleißfaktoren. Zum Beispiel binden ASF/SF2 und SC35 mit Hilfe der SR-Domäne an das U1-70K Protein, das spezifisch am snRNP U1 gebunden ist (Wu & Maniatis, 1993). Weil die SR-Dipeptide der SR-Domäne einen positiv geladenen Charakter verleihen, wird diskutiert, daß diese Domäne auch mit der RNA interagieren könnte (Tacke & Manley, 1999).

An Stelle der SR-Dipeptide befindet sich in der carboxyterminalen Domäne von Srp2 ein Sequenzmotiv, das sich insgesamt elfmal wiederholt (DEYRR). In diesem Sequenzmotiv folgen, von der Aminosäure Tyrosin getrennt, zwei negativ geladene auf zwei positiv geladene Aminosäuren. In den SR-Proteinen aus dem Menschen entsteht ein ähnliches Muster aus alternierenden negativen und positiven Ladungen, wenn die SR-Dipeptide der SR-Domäne phosphoryliert sind (Colwill *et al.*, 1996a,b, Duncan *et al.*, 1998).

Die carboxyterminale Domäne von Srp2 könnte deshalb eine analoge Funktion wie die SR-Domäne der SR-Proteine besitzen. Tatsächlich wurde beobachtet, daß Srp1 *in vitro* und *in vivo* an Srp2 binden kann, doch zur Zeit ist noch unklar welche Domänen von Srp1 und Srp2 für diese Interaktion verantwortlich sind (Tang *et al.*, 1999a,b).

Eine weitere Aufgabe der SR-Domäne besteht darin als Phosphorylierungsstelle verschiedener Proteinkinasen zu dienen (Colwill *et al.*, 1996a,b, Duncan *et al.*, 1998). Die Phosphorylierung der SR-Dipeptide beeinflußt sowohl die Aktivität der SR-Proteine bei der Spleißreaktion, als auch deren subnucleäre Lokalisation (Kanopka *et al.*, 1998, Prasad *et al.*, 1999). Der Austausch der Tyrosine in der carboxyterminalen Domäne hat gezeigt, daß das Sequenzmotiv DEYRR nicht für die Funktion von Srp2 erforderlich ist. Daher ist es unwahrscheinlich, daß dieses Sequenzmotiv als Phosphorylierungsstelle dient bzw. die Phosphorylierung der Tyrosine für die Funktion von Srp2 essentiell ist.

Um so wahrscheinlicher ist es, daß die SR-Dipeptid Elemente von Srp2 als Phosphorylierungsstellen dienen. Tatsächlich ist Srp2 ein Phosphoprotein, denn Kinaseassays, in denen das immunpräzipitierte Srp2 Protein in Gegenwart von γ -ATP eingesetzt wurde, haben ergeben, daß in Proteinextrakten von *S.pombe* eine Kinaseaktivität enthalten ist, die Srp2 phosphorylieren kann (Gross, 1997b).

In *S.pombe* wurde eine Kinase identifiziert, die in der Lage ist die SR-Dipeptide von Spleißfaktoren zu phosphorylieren. Diese Kinase, Dsk1 genannt, ist das funktionelle Homolog der Kinase SRPK1 aus dem Menschen. *In vitro* kann diese Kinase die SR-Dipeptide der großen Untereinheit des Spleißfaktors U2AF⁶⁵ von *S.pombe* und die RS-Domäne von ASF/SF2 phosphorylieren (Tang *et al.*, 1998). Neuere Untersuchungen von Tang *et al.* (1999a,b) zeigen, daß Dsk1 in der Lage ist Srp2 und Srp1 zu phosphorylieren. Derzeit wird mit Hilfe der mutierten *srp2* cDNAs untersucht, ob dabei die SR-Dipeptide oder das Sequenzmotiv DEYRR in der argininreichen Domäne phosphoryliert wird.

Weil die Kinase SRPK1 aus dem Menschen die subnucleäre Lokalisation der SR-Proteine reguliert (Colwill *et al.*, 1996b, Koizumi *et al.*, 1999) und die Kinase Dsk1 sowohl im Cytoplasma, als auch im Zellkern der *S.pombe* Zellen vorkommt (Tang *et al.*, 1998, Wang *et al.*, 1998) wäre es interessant zu untersuchen, ob sich die Phosphorylierung auch auf die Lokalisation von Srp2 auswirkt. Dies könnte beispielsweise durch die

Co-Expression der Dsk1 Kinase und der Srp2-GFP Fusionen in *S.pombe* Zellen oder durch den Austausch der Serine der SR-Elemente durch die negativ geladene Aminosäure Aspartat untersucht werden.

4.3 Wird Srp2 für das Spleißen einer spezifischen prä-mRNA benötigt?

Bisher hat die Charakterisierung von Srp2 ergeben, daß dieses Protein sowohl in Sequenz, seiner Struktur, als auch in der Funktion der verschiedenen Domänen den SR-Proteinen aus dem Menschen ähnlich ist. Auch wenn bisher keine direkte Beteiligung von Srp2 an der Spleißreaktion nachgewiesen wurde, spricht vieles dafür, daß Srp2 in *S.pombe* am Spleißen von prä-mRNA beteiligt sein könnte. Doch welche Aufgabe könnte dieses Protein bei der Spleißreaktion haben?

Bei der Gene-Disruption des *srp2* Gens wurde festgestellt, daß *srp2* für das mitotische Wachstum der *S.pombe* Zellen essentiell ist. Daraufhin wurde ein konditional letaler *S.pombe* Stamm hergestellt, in dem die Expression des *srp2* Gens reprimiert werden kann. Bei der Charakterisierung dieses Stamms wurde beobachtet, daß die Zellen bei der Repression von Srp2 zwar nicht mehr wachsen, aber nach wie vor *tfl1d* prä-mRNA spleißen können.

Das könnte bedeuten, daß Srp2 nicht für das Spleißen von prä-mRNA erforderlich ist. Eine andere Möglichkeit ist, daß Srp2 für das Spleißen von einer oder mehreren spezifischen prä-mRNAs erforderlich ist. Dafür spricht die Funktion der zweiten RNA-Bindungsdomäne, die die Spezifität von Srp2 festzulegen scheint.

Auch bei der Untersuchung von SR-Proteinen aus der Fruchtfliege *Drosophila* wurde festgestellt, daß diese Spleißfaktoren *in vivo* sehr spezifische Aufgaben haben können. Zum Beispiel kann das SR-Protein B52/SRp55 das Spleißen verschiedener prä-mRNA Substrate *in vitro* in HeLa S100 Extrakten komplementieren, das auf eine generelle Funktion bei der Spleißreaktion hindeutet (Mayeda *et al.*, 1992).

Wenn das B52/SRp55 Gen von *Drosophila* deletiert wurde, konnten sich die Fliegen nur bis zum zweiten Larvenstadium entwickeln. Dennoch wurde das konstitutive und alternative Spleißen von 5 getesteten prä-mRNAs durch die Deletion von B52/SRp55 *in vivo* nicht beeinträchtigt (Ring & Lis, 1994). Das zeigt, daß sich die Funktion der SR-Proteine *in vitro* zwar überschneidet, *in vivo* aber sehr spezifisch sein kann. Dies stimmt mit der Vorstellung überein, daß durch die sequenzspezifische Bindung der SR-Proteine an Splicing Enhancer Sequenzen das alternative Spleißen verschiedener prä-mRNAs reguliert wird (Mayeda *et al.*, 1999).

Deshalb wäre es möglich, daß auch Srp2 von *S.pombe* für das Spleißen von einer oder mehreren spezifischen prä-mRNAs verantwortlich ist. Mit Hilfe des Differential Display wurde versucht prä-mRNAs zu isolieren die abhängig von Srp2 gespleißt werden. Durch die Repression von *srp2* im konditional letalen Stamm könnten diese nicht mehr oder nur noch unvollständig gespleißt werden. Es wurden mehrere PCR-Produkte erhalten, deren Größe sich bei der Repression von *srp2* verändert hat. Doch nach der Reamplifizierung der Banden wurde mit Hilfe der Southern Hybridisierung festgestellt, daß diese PCR-Produkte nicht aus denselben Transkripten hervorgegangen sind.

Wie bereits diskutiert, könnte dies methodisch bedingt sein, denn die Zugabe von Thiamin reprimiert im konditional letalen Stamm nicht nur die Expression von *srp2*, sondern beeinflusst auch die Expression von Genen des Thiaminstoffwechsels.

4.4 Wird das Spleißen von prä-mRNA in *S.pombe* von SR-Proteinen reguliert?

Es wird angenommen, daß *S.pombe* nicht zum alternativen Spleißen von prä-mRNA in der Lage ist, weil bisher noch keine alternativ gespleißten cDNA isoliert wurden. In höheren

Eukaryonten wird das alternative Spleißen hauptsächlich von den SR-Proteinen reguliert. Die Isolierung der Gene *srp1* und *srp2* ist ein Hinweis dafür, daß die Spleißreaktion auch in *S.pombe* von SR-Proteinen reguliert werden könnte. Tatsächlich erfüllt *S.pombe* einige wichtige Voraussetzungen, die für das alternative Spleißen von prä-mRNA erforderlich sind:

Zum Beispiel ist für das alternative Spleißen eine mosaikartige Struktur der Gene erforderlich, die eine Kombination von verschiedenen Exons in unterschiedlicher Reihenfolge erlaubt. Schon lange ist bekannt, daß mehr als 40 % der *S.pombe* Gene Introns enthalten. Viele *S.pombe* Gene haben multiple Introns, wie z. B. das *srp2* Gen. Darüber hinaus haben Untersuchungen ergeben, daß *S.pombe* sogar Introns von höheren Eukaryonten *in vivo* spleißen kann, was zeigt, daß der Spleißapparat von *S.pombe* dem der höheren Eukaryonten sehr ähnlich ist (Kaeufer *et al.*, 1985).

Die Phosphorylierung von Srp1 und Srp2 durch die Proteinkinase Dsk1 deutet darauf hin, daß das Spleißen von prä-mRNA in *S.pombe* auf ähnliche Art und Weise reguliert sein könnte wie in höheren Eukaryonten. Denn es wird angenommen, daß beim alternativen Spleißen das Konzentrationsverhältnis und die Aktivität der verschiedenen SR-Proteine über die Auswahl von alternativen Spleißstellen entscheidet. Sowohl Konzentration als auch die Aktivität der SR-Proteine wird durch die Phosphorylierung moduliert (Kanopka *et al.*, 1998, Papoutsopoulou *et al.*, 1999, Prasad *et al.*, 1999, Xiao & Manley, 1996).

Auch die Interaktion von Srp1 und Srp2 läßt darauf schließen, daß auch *S.pombe* Introns durch ein komplexes Netzwerk von Protein-Protein und Protein-RNA Wechselwirkungen erkannt werden.

Damit erfüllt *S.pombe* viele Voraussetzungen, die für das alternative bzw. regulierte Spleißen von prä-mRNA erforderlich sind. Einige Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen diese Hypothese:

Viele SR-Proteine regulieren die Auswahl von alternativen Spleißstellen, indem sie an kurze, zumeist purinreiche Sequenzelemente der prä-mRNA binden. Diese werden als Splicing Enhancer bezeichnet. Sie kommen häufig in der Nähe von Introns vor, deren Spleißstellen von der Konsensussequenz abweichen und wurden in prä-mRNAs gefunden, die alternativ gespleißt werden.

Das Exon 6 des *srp2* Gens enthält eine kurze purinreiche Sequenz, die große Ähnlichkeit mit der Sequenz von Splicing Enhancer Elementen hat. Deshalb wurde untersucht, ob von der *srp2* cDNA alternativ gespleißte Formen existieren. Mit Hilfe der RT-PCR und einer Koloniehybridisierung konnten drei verschiedene mRNAs des *srp2* Gens isoliert werden, aus denen die Introns 4, 6 und 9 nicht herausgespleißt waren. Die Isolierung dieser mRNAs könnte ein Zeichen dafür sein, daß diese Introns schlecht aus der *srp2* prä-mRNA herausgespleißt werden.

Eine andere Möglichkeit wäre, daß diese unvollständig gespleißten mRNAs eine regulatorische Funktion haben, denn von einigen SR-Proteinen aus dem Menschen wurden ebenfalls unvollständig gespleißte cDNAs isoliert (Du & Taub, 1997, Jumaa *et al.*, 1997, Kraemer *et al.*, 1998, Screaton *et al.*, 1995).

Diese cDNAs kodieren für verkürzte Formen der SR-Proteine, die nur noch aus der ersten RNA-Bindungsdomäne bestehen. Es wird angenommen, daß sie eine autoregulatorische Funktion haben könnten, mit der die Konzentration der SR-Proteine in der Zelle reguliert wird. Beispielsweise enthält das SRp20 Gen aus dem Menschen eine Splicing Enhancer Sequenz, an die ASF/SF2 binden kann. Wenn ASF/SF2 überexprimiert wird, entsteht eine verkürzte Form von SRp20, die nur noch aus der ersten RNA-Bindungsdomäne besteht (Jumaa & Nielsen, 1997).

Im *srp2* Gen wird die erste RNA-Bindungsdomäne von den Exons 1–6 kodiert. Wenn das Intron 6 nicht herausgespleißt ist, dann kodiert diese mRNA für ein Protein, das nur aus der ersten RNA-Bindungsdomäne von Srp2 besteht. Welche Funktion dieses verkürzte Protein hat ist jedoch unklar, denn dieser Teil von Srp2 wird weder in den Zellkern transportiert, noch wirkt sich die Überexpression dieses Teils von Srp2 auf das Wachstum der *S.pombe* Zellen oder das Spleißen der *tfl1d* prä-mRNA aus.

Durch die Fusion mit dem *lacZ* Gen von *E.coli* wurde untersucht, ob das Spleißen der *srp2* prä-mRNA von der purinreichen Sequenz abhängig ist. Wie der Vergleich der β -Galaktosidase Aktivität gezeigt hat, wirkt sich die Deletion der purinreichen Sequenz jedoch nicht auf das Spleißen von *srp2* aus.

Dennoch gibt es Hinweise dafür, daß diese Sequenz das Spleißen von prä-mRNA fördert: Wenn die purinreiche Sequenz des *srp2* Gens in das Exon 4 des *dsx* Gens von *Drosophila* eingefügt wurde, das ohne Splicing Enhancer nicht gespleißt wird, dann konnte die Spleißreaktion in HeLa S100 Zellextrakten *in vitro* aktiviert werden (Bindereif, 1999).

Weshalb sich die Deletion der purinreichen Sequenz nicht auf das Spleißen der *srp2* prä-mRNA auswirkt kann vielfältige Ursachen haben: In vielzelligen Lebewesen wird das alternative Spleißen insbesondere bei der gewebs- und entwicklungsspezifischen Differenzierung beobachtet. Prozesse die mit der Differenzierung einer eukaryontischen Zelle vergleichbar sind, finden in der Spalthefe während der Paarung, der Meiose und der Sporulation statt. Dabei wird aus zwei haploiden Zellen eine diploide Zygote gebildet, die sich zu einem Ascus entwickelt, in dem vier haploide Ascosporen entstehen.

Untersuchungen haben ergeben, daß dabei das Spleißen einzelner prä-mRNAs reguliert werden kann: Zum Beispiel wird das *mes1*⁺ Gen, das für die Meiose essentiell ist, nur bei Stickstoffmangel transkribiert. Die *mes1*⁺ prä-mRNA wird nur in diploiden Zellen gespleißt, während haploide Zellen die ungespleißte prä-mRNA akkumulieren (Kishida *et al.*, 1994). Diese Beobachtungen zeigen, daß das Spleißen von prä-mRNAs in *S.pombe* unter bestimmten Wachstumsbedingungen reguliert sein kann. Deshalb wäre es möglich, daß auch das Spleißen der *srp2* nur unter spezifischen Wachstumsbedingungen reguliert wird.

Eine andere Möglichkeit ist, daß die purinreiche Sequenz nur eines von vielen Sequenzelementen ist, die das Spleißen der *srp2* prä-mRNA beeinflussen, denn neuere Untersuchungen haben ergeben, daß in den prä-mRNAs von eukaryontischen Genen wesentlich mehr regulatorische Elemente vorkommen, als bisher angenommen wurde: So können z. B. Splicing Silencer Elemente das Spleißen einer prä-mRNA hemmen (Kan & Green, 1999, Zheng *et al.*, 1998), stromabwärts gelegene 5'-Spleißstellen wie ein Splicing Enhancer Element wirken (Yue & Akusjaervi, 1999), oder die Sekundärstruktur der prä-mRNA das Herausspleißen von Introns verhindern (Muro *et al.*, 1999).

Erst das komplexe Zusammenspiel der verschiedenen Sequenzelemente, Spleißfaktoren und der Sekundärstruktur entscheidet darüber, ob und wie eine prä-mRNA gespleißt wird. Es kann deshalb nicht ausgeschlossen werden, daß in der *srp2* prä-mRNA weitere Sequenzelemente vorkommen, die das Spleißen regulieren. Die Identifizierung dieser Sequenzelemente gestaltet sich jedoch als schwierig, solange die Bedingungen unbekannt sind, unter denen das Spleißen der *srp2* prä-mRNA reguliert werden könnte.

Es bleibt daher ungeklärt, ob das Spleißen in *S.pombe* reguliert ist und welche Rolle die SR-Proteine dabei spielen. Möglicherweise wird die Auswertung der Sequenzen des *S.pombe* Sequenzierprojekts Aufschluß darüber geben, ob die Expression von *S.pombe* Genen durch alternatives Spleißen reguliert werden kann. In jedem Fall macht Isolierung von Srp1 und Srp2 die Spalthefe zu einem attraktiven Modellsystem, um die Funktion der SR-Proteine *in vivo* näher zu charakterisieren.

5 Zusammenfassung

Aus der Spaltheife *Schizosaccharomyces pombe* wurde das *srp2* Gen isoliert. Es besteht aus 10 Exons und 9 Introns und hat eine Länge von 1.716 bp. Das offene Leseraster von *srp2* kodiert für ein Protein von 365 Aminosäuren. Das *srp2* Gen ist für das mitotische Wachstum von *S.pombe* essentiell.

Srp2 gehört zur Familie der SR-Proteine. Die SR-Proteine sind Spleißfaktoren, die an der Erkennung und Auswahl von Spleißstellen beim konstitutiven und alternativen Spleißen von prä-mRNA beteiligt sind.

Srp2 ist aus zwei aminoterminalen RNA-Bindungsdomänen und einer carboxyterminalen argininreichen Domäne zusammengesetzt. Die RNA-Bindungsdomänen enthalten die für RNA-bindende Proteine typischen Sequenzmotive RNP-1 und RNP-2.

Des weiteren enthalten die RNA-Bindungsdomänen zwei für SR-Proteine charakteristischen Signatursequenzen, DARDAR und SWQDLKD, die in allen SR-Proteinen mit zwei RNA-Bindungsdomänen konserviert sind.

In der carboxyterminalen Domäne unterscheidet sich Srp2 von einem typischen SR-Protein. Nur am Beginn und am Ende dieser Domäne kommen zwei kurze SR-Dipeptid Elemente vor, die in den SR-Proteinen aus dem Menschen in größerer Zahl vorhanden sind. Stattdessen enthält diese Domäne ein Sequenzmotiv, DEYRR, das sich insgesamt elfmal wiederholt.

Durch die Fusion mit dem Green Fluorescent Protein wurde festgestellt, daß Srp2 ein Kernprotein ist. Mit Hilfe einer gerichteten Mutagenese wurde gezeigt, daß die SR-Dipeptid Elemente als Kerntransportsignal dienen.

Durch die Überexpression in *S.pombe* wurde der Einfluß der verschiedenen Domänen von Srp2 auf das Wachstum der Zellen und das Spleißen von prä-mRNA getestet. Dabei zeigte sich, daß die zweite RNA-Bindungsdomäne über die spezifische Funktion von Srp2 bestimmt.

Die Funktion der Signatursequenzen wurde mit Hilfe einer gerichteten Mutagenese untersucht. Dabei zeigte sich, daß die Signatursequenz SWQDLKD, aber nicht die Signatursequenz DARDAR für die Funktion von Srp2 essentiell ist.

Um die Funktion von *srp2* durch Komplementation untersuchen zu können wurde ein konditional letaler Stamm hergestellt, in dem die Expression von *srp2* reprimiert werden kann. Die Charakterisierung dieses Stamms ergab, daß Srp2 wahrscheinlich für das Spleißen spezifischer prä-mRNAs benötigt wird.

Mit Hilfe des Differential Display wurde versucht mRNAs zu isolieren, die abhängig von Srp2 gespleißt werden.

Im Exon 6 des *srp2* Gens kommt eine purinreiche Sequenz vor, die einem Splicing Enhancer Element ähnelt. Durch die Fusion von Srp2 mit dem *lacZ* Gen von *E.coli* wurde getestet, ob das Spleißen der *srp2* prä-mRNA von dieser Sequenz beeinflusst wird.

Mit Hilfe der RT-PCR wurde untersucht, ob in *S.pombe* alternativ gespleißte Formen der *srp2* mRNA vorkommen. Es wurden drei verschiedene cDNAs isoliert, aus denen verschiedene Introns nicht herausgespleißt waren. Diese cDNAs haben Ähnlichkeit mit alternativ gespleißten Formen der SR-Proteine aus dem Menschen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen darauf schließen, daß Srp2 am Spleißen von prä-mRNA beteiligt ist und weisen darauf hin, daß die Spleißreaktion in *S.pombe* auf ähnliche Weise reguliert werden könnte wie in höheren Eukaryonten.

6 Literaturverzeichnis

- ALAHARI, S.K., SCHMIDT, H., & KAEUFER, N.F. 1993. The fission yeast *prp4⁺* gene involved in pre-mRNA splicing codes for a predicted serine/threonine kinase and is essential for growth. *Nucleic Acids Res.*, **21**, 4079–4083. [7](#)
- ALFA, C., FANTES, P., HYAMS, J., MCLEOD, M., & WARBRICK, E. 1993. *Experiments with Fission Yeast: A Laboratory Course Manual*. N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. [11](#)
- ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W., & LIPMAN, D.J. 1990. Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol. Biol.*, **215**, 403–410. [37](#)
- APOLINARIO, E., NOCERO, M., JIN, M., & HOFFMAN, C.S. 1993. Cloning and manipulation of the *Schizosaccharomyces pombe his7⁺* gene as a new selectable marker for molecular genetic studies. *Curr. Genet.*, **24**, 491–495. [56](#)
- BARBET, N., MURIEL, W.J., & A.CARR. 1992. Versatile shuttle vectors and genomic libraries for use with *Schizosaccharomyces pombe*. *Gene*, **114**, 59–66. [19](#), [42](#)
- BASI, G., SCHMID, E., & MAUNDRELL, K. 1993. TATA box mutations in the *Schizosaccharomyces pombe nmt1* promotor affect transcription efficiency but not the transcription start point or thiamine repressibility. *Gene*, **123**, 131–136. [55](#)
- BINDEREIF, DR. ALBRECHT. 1999. *Pers. Mitteilung*. Medizinische Fakultät Charité der Humboldt Universität zu Berlin, Institut fuer Biochemie. [86](#)
- BIRNEY, E., KUMAR, S., & KRAINER, A.R. 1993. Analysis of the RNA-recognition motif and RS and RGG domains: conservation in metazoan pre-mRNA splicing factors. *Nucleic Acids Res.*, **21**(25), 5803–5816. [3](#), [4](#), [39](#), [53](#), [80](#)
- BROWN, M.G.M., WESTON, A., SAUNDERS, J.R., & HUMPHREYS, G.O. 1975. Transformation of *E.coli* C600 by plasmid DNA at different phases of growth. *FEMS Microbiol. Lett.*, **5**, 219–222. [25](#)
- BUVIOLI, M., MAYER, S.A., & PATTON, J.G. 1997. Functional crosstalk between exon enhancers, polypyrimidin tracts and branchpoint sequences. *EMBO J.*, **16**(23), 7174–7183. [4](#)
- CACERES, J.F., & KRAINER, A.R. 1993. Functional Analysis of pre-mRNA splicing factor SF2/ASF structural domains. *EMBO J.*, **12**(12), 4715–4726. [3](#), [67](#), [82](#)
- CACERES, J.F., MISTELI, T., SCREATON, G.R., SPECTOR, D.L., & KRAINER, A.R. 1997. Role of the modular domains of SR proteins in subnuclear localization and alternative splicing specificity. *J. Cell Biol.*, **138**(2), 225–238. [47](#), [82](#)
- CAO, W., JAMISON, S.F., & GARCIA-BLANCO, M.A. 1997. Both phosphorylation and dephosphorylation of ASF/SF2 are required for pre-mRNA splicing in vitro. *RNA*, **3**, 1456–1467. [5](#)
- CHABOT, B. 1996. Directing alternative Splicing: Casts and Scenarios. *Trends Genet.*, **12**(11), 472–478. Review. [4](#), [5](#)
- CHALFIE, M., TU, Y., EUSKIRCHEN, G., WARD, W., & PRASHER, D.C. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, **263**, 802–805. [46](#)

- CHANDLER, S.D., MAYEDA, A., YEAKLEY, J.M., KRAINER, A.R., & FU, X.D. 1997. RNA splicing specificity determined by the coordinated action of RNA recognition motifs in SR proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**(4), 3569–3601. [66](#)
- CHEN, T., & ZHANG, M.Q. 1998. Pombe: A Gene finding and Exon-intron Structure Prediction System for Fission Yeast. *Yeast*, **14**, 701–710. [37](#)
- COLWILL, K., PAWSON, T., ANDREWS, B., PRASAD, J., MANLEY, J.L., BELL, J.C., & DUNCAN, P. 1996a. The Clk/Sty protein kinase phosphorylates SR splicing factors and regulates their intranuclear distribution. *EMBO J.*, **15**, 265–275. [5](#), [83](#)
- COLWILL, K., FENG, L.L., YEAKLEY, J.M., GISH, G.D., CACERES, J.F., PAWSON, T., & FU, X.D. 1996b. SRPK1 and Clk/Sty1 Protein Kinases Show Distinct Substrate Specificities for Serine/Arginine-rich Splicing Factors. *J. Biol. Chem.*, **271**(40), 24569–24575. [5](#), [83](#)
- COOLIDGE, C.J., SEELY, R.J., & PATTON, J.G. 1997. Functional analysis of the polypyrimidine tract in pre-mRNA splicing. *Nucleic Acids Res.*, **25**(4), 888–896. [1](#)
- COOPER, T.A., & MATTOX, W. 1997. The regulation of splice-site selection, and its role in human disease. *Am. J. Hum. Genet.*, **61**, 259–266. Review. [3](#)
- DINGWALL, C. 1991. Transport Across the Nuclear Envelope: Enigmas and Explanations. *BioEssays*, **13**, 213–218. [47](#), [82](#)
- DINGWALL, C., & LASKEY, R.A. 1991. Nuclear targeting sequences - a consensus? *Trends Biochem. Sci.*, **16**, 478–481. [47](#), [82](#)
- DU, K., & TAUB, R. 1997. Alternative Splicing and Structure of the human and mouse SFRS5/HRS/SRp40 genes. *Gene*, **204**, 243–249. [6](#), [73](#), [85](#)
- DUNCAN, P.I., STOJDL, D.F., MARIUS, R.M., & BELL, J.C. 1997. *In vivo* regulation of alternative pre-mRNA splicing by the Clk1 protein kinase. *Mol. Cell. Biol.*, **17**(10), 5996–6001. [5](#)
- DUNCAN, P.I., STOJDL, D.F., MARIUS, R.M., SCHEIT, K.H., & BELL, J.C. 1998. The Clk2 and Clk3 Dual-Specificity Protein Kinases Regulate the Intranuclear Distribution of SR Proteins and influence Pre-mRNA Splicing. *Exp. Cell Res.*, **241**, 300–308. [5](#), [83](#)
- EGEL, R. 1971. Physiological aspects of conjugation in fission yeast. *Planta*, **98**, 89–96. [11](#)
- FORSBURG, S.L. 1993. Comparison of *Schizosaccharomyces pombe* expression systems. *Nucleic Acids Res.*, **21**, 2955–2956. [57](#)
- FU, X.D. 1995. The superfamily of arginine/serine-rich splicing factors. *RNA*, **1**, 663–680. [3](#), [5](#)
- GAMA-CARVALLHO, M., KRAUSS, R.D., CHIANG, L., VALCARCEL, J., GREEN, M.R., & CARMO-FONSECA, M. 1997. Targeting of U2AF⁶⁵ to Sites of Active Splicing in the Nucleus. *J. Cell Biol.*, **137**(5), 975–987. [47](#)
- GATTERMANN, K.B., ROSENBERG, G.H., & KAEUFER, N.F. 1988. Doublestranded sequencing using mini prep plasmids, in eleven hours. *BioTechniques*, **6**, 7–7. [25](#)
- GATTO-KONCZAK, F.D., OLIVE, M., GESNEL, M.C., & BREATHNACH, R. 1999. hnRNP A1 recruited to an exon *in vivo* can function as an exon splicing silencer. *Mol. Cell. Biol.*, **19**(1), 251–260. [4](#)

- GE, H., & MANLEY, J.L. 1990. A protein factor, ASF, controls cell-specific alternative splicing of SV40 early pre-mRNA in vitro. *Cell*, **62**, 25–34. 4
- GEBAUER, F., MERENDINO, L., HENTZE, M.W., & VALCARCEL, J. 1998. The *Drosophila* splicing regulator sex-lethal directly inhibits translation of male-specific-lethal 2 mRNA. *RNA*, 142–150. 344. 4
- GRAVELEY, B.R., HERTEL, K.J., & MANIATIS, T. 1998. A systematic analysis of the factors that determine the strength of pre-mRNA splicing enhancers. *EMBO J.*, **22**(17), 6747–6756. 72
- GROSS, T. 1997a. *GFP Vectors for fission yeast Schizosaccharomyces pombe*. Institut fuer Genetik, TU Braunschweig. 16, 46
- GROSS, T. 1997b. *Pers. Mitteilung*. Institut fuer Genetik, TU Braunschweig. 83
- GROSS, T. 1999 (Jan.). *Praktikum Bakterien und Phagengenetik*. Institut fuer Genetik, TU Braunschweig. 66
- GROSS, T., LUETZELBERGER, M., WIEGMANN, H., KLINGENHOFF, A., SHENOY, S., & KAEUFER, N.F. 1997. Functional analysis of the fission yeast Prp4 protein kinase involved in pre-mRNA splicing and isolation of a putative mammalian homologue. *Nucleic Acids Res.*, **25**(5), 1028–1035. 7, 79
- GROSS, T., RICHERT, K., MIERKE, C., LUETZELBERGER, M., & KAEUFER, N.F. 1998. Identification and characterization of *srp1*, a gene of fission yeast encoding a RNA binding domain and a RS domain typical of SR splicing factors. *Nucleic Acids Res.*, **26**(2), 505–511. 7, 49, 50, 52, 53, 55
- GRUNSTEIN, M., & HOGNESS, D.S. 1975. Colony Hybridisation: A Method for the Isolation of cloned DNAs that contain a specific Gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 3961. 28
- GUARENTE, L. 1991. Yeast Promoters and lacZ Fusions Designed to Study Expression of Cloned Genes in Yeast. *Methods Enzymol.*, **101**, 181–191. 11, 25, 77
- GUI, J.F., TRONCHERE, H., CHANDLER, S.D., & FU, X.D. 1994a. Purification and characterization of a kinase specific for the serine- and arginine-rich pre-mRNA splicing factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 10824–10828. 6
- GUI, J.F., LANE, W.S., & FU, X.D. 1994b. A serine kinase regulates intracellular localization of splicing factors in the cell cycle. *Nature*, **369**, 678–682. 6
- GUTZ, H., HESLOT, H., LEUPOLD, U., & LOPRIENO, N. 1974. *Schizosaccharomyces pombe*. Handbook of Genetics, vol. 1. New York, London: Plenum Press. 11
- HANAMURA, A., CACERES, J.F., MAYEDA, A., FRANZA, B.R., & KRAINER, A.R. 1998. Regulated tissue-specific expression of antagonistic pre-mRNA splicing factors. *RNA*, **4**, 430–444. 5
- HANDA, N., NUREKI, O., KURIMOTO, K., KIM, I., SAKAMOTO, H., SHIMURA, Y., MUTO, Y., & YOKOYAMA, S. 1999. Structural basis for recognition of the *tra* mRNA precursor by the Sex-lethal protein. *Nature*, **398**, 579–585. 80, 81
- HEDLEY, M.L., AMREIN, H., & MANIATIS, T. 1995. An amino acid sequence motif sufficient for subnuclear localization of an arginine/serine-rich splicing factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 11524–11528. 47
- HERTEL, C., LYNCH, K.W., & MANIATIS, T. 1997. Common themes in the function of transcription and splicing enhancers. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **9**, 350–357. Review. 4

- HOFFMANN, A., HORIKOSHI, M., WANG, C.K., SCHROEDER, S., WEIL, P.A., & RÖDER, R.G. 1990. Cloning of the *Schizosaccharomyces pombe* *tf1ld* gene reveals a strong conservation of functional domains present in Saccharomyces. *Genes Dev.*, **4**, 1141–1148. [52](#)
- HOROWITZ, D.S., & KRAINER, A.R. 1994. Mechanisms for selecting 5' splice sites in mammalian pre-mRNA splicing. *Trends Genet.*, **10**, 100–106. [4](#)
- JUMAA, H., & NIELSEN, P.J. 1997. The splicing factor SRp20 modifies splicing of its own mRNA and ASF/SF2 antagonizes this regulation. *EMBO J.*, **16**(16), 5077–5085. [6](#), [73](#), [85](#)
- JUMAA, H., GUENET, J.L., & NIELSEN, P.J. 1997. Regulated Expression and RNA Processing of Transcripts from the SRp20 Splicing Factor Gene during the Cell Cycle. *Mol. Cell. Biol.*, **17**(6), 3116–3124. [85](#)
- KAEUFER, N.F., SIMANIS, V., & NURSE, P. 1985. Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe* correctly excises a mammalian RNA transcript intervening sequence. *Nature*, **318**, 78–80. [7](#), [85](#)
- KAN, J.L.C., & GREEN, M. 1999. Pre-mRNA splicing of IgM exons M1 and M2 is directed by a juxtaposed splicing enhancer and inhibitor. *Genes Dev.*, **13**, 462–471. [86](#)
- KANOPKA, A., MÜHLEMANN, O., PETERSEN-MAHRT, S., ESTMER, C., OEHRMANN, C., & AKUSJAEVI, GOEREAN. 1998. Regulation of alternative RNA splicing by dephosphorylation of SR proteins. *Nature*, **393**, 185–187. [5](#), [6](#), [83](#), [85](#)
- KATAOKA, N., BACHORIK, J., & DREYFUSS, G. 1999. Transportin-SR, a Nuclear Import Receptor for SR Proteins. *J. Cell Biol.*, **145**(6), 1145–1152. [83](#)
- KEENEY, J.B., & BOEKE, J.D. 1994. Efficient targeted integration at leu1-32 and ura4-294 in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics*, **136**, 849–856. [57](#)
- KISHIDA, M., NAGAI, T., NAKASEKO, Y., & SHIMODA, C. 1994. Meiosis dependent mRNA splicing of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* *mes1⁺* gene. *Curr. Genet.*, **25**, 497–503. [86](#)
- KOIZUMI, J., OKAMOTO, Y., ONOGI, H., MAYEDA, A., KRAINER, A.R., & HAGIWARA, M. 1999. The subcellular localization of ASF/SF2 is regulated by direct interaction with SR protein kinases (SRPKs). *J. Biol. Chem.*, **274**(16), 11125–11131. [6](#), [83](#)
- KRAEMER, A. 1996. The structure and function of proteins involved in mammalian pre-mRNA splicing. *Annu. Rev. Biochem.*, **65**, 367–409. [82](#)
- KRAEMER, A., QUENTIN, M., & MULHAUSER, F. 1998. Diverse modes of alternative splicing of human splicing factor SF1 deduced from the exon-intron structure of the gene. *Gene*, **211**, 29–37. [85](#)
- KRAINER, A.R., MAYEDA, A., & KOZAK, D. 1990. Purification and characterization of pre-mRNA splicing factor SF2 from HeLa cells. *Genes Dev.*, **4**, 1158–1171. [4](#)
- KRAULIS, P. 1991. Molscript: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J. App. Crystallogr.*, **24**, 946–950. [37](#), [80](#)
- KUNKEL, T.A., ROBERTS, J.D., & ZAKOUR, R.A. 1987. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Methods Enzymol.*, **154**, 367–382. [34](#), [48](#), [66](#)

- KUROYANAGI, N., ONOGI, H., WAKABAYASHI, T., & HAGIWARA, M. 1998. Novel SR-Protein-Specific Kinase, SRPK2, Disassembles Nuclear Speckles. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **242**, 357–364. [6](#)
- LAMM, G.M., & LAMOND, A.I. 1993. Non-snRNP protein splicing factors. *Biochim. Biophys. Acta*, **1173**, 247–265. Review. [1](#), [3](#)
- LAMOND, A.I. 1993. The Spliceosome. *BioEssays*, **15**(9), 595–603. [1](#)
- LEUPOLD, U. 1950. Die Vererbung von Homothallie und Heterothallie bei *Schizosaccharomyces pombe*. *C. R. Trav. Lab. Carlsberg, Ser. Physiol.*, **24**, 381–480. [11](#)
- MADHANI, H.D., & GUTHRIE, C. 1994. Dynamic RNA-RNA Interactions in the Spliceosome. *Annu. Rev. Genet.*, **28**, 1–26. Review. [2](#)
- MANLEY, J.L., & TACKE, R. 1996. SR proteins and splicing control. *Genes Dev.*, **10**, 1569–1579. [3](#)
- MAUNDRELL, K. 1989. *nmt1* of Fission Yeast is a highly expressed gene completely repressed by thiamine. *J. Biol. Chem.*, **265**, 10857–10864. [46](#), [60](#)
- MAUNDRELL, K. 1993. Thiamine-repressible expression vectors pREP and pRIP for fission yeast. *Gene*, **123**, 127–130. [13](#), [55](#), [64](#)
- MAYEDA, A., ZAHLER, A.M., KRAINER, A., & ROTH, M.B. 1992. Two members of a conserved family of nuclear phosphoproteins are involved in pre-mRNA splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 1301–1304. [84](#)
- MAYEDA, A., SCREATOR, G.R., CHANDLER, S.D., FU, X-D., & KRAINER, A.R. 1999. Substrate Specificities of SR Proteins in Constitutive Splicing Are Determined by their RNA Recognition Motifs and Composite Pre-mRNA Exonic Elements. *Mol. Cell. Biol.*, **19**(3), 1853–1863. [81](#), [84](#)
- MCKEOWN, M. 1993. The Role of small nuclear RNAs in RNA splicing. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **5**, 448–454. Review. [1](#)
- MERRITT, E.A., & BACON, D.J. 1997. Raster3D photorealistic molecular graphics. *Methods Enzymol.*, **277**, 505–524. [37](#), [80](#)
- MISTELI, T., CACERES, J.F., & SPECTOR, D.L. 1997. The dynamics of a pre-mRNA splicing factor in living cells. *Nature*, **387**(5), 523–527. [6](#)
- MITCHISON, J.M. 1970. Physiological and cytological methods for *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Cell Physiol.*, **4**(131-165). [60](#)
- MORENO, S., KLAR, A., & NURSE, P. 1991. Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol.*, **194**, 795–823. [11](#)
- MOUNT, S. 1997. Genetic depletion reveals an essential role for an SR protein splicing factor in vertebrate cells. *BioEssays*, **19**(3), 189–192. [4](#)
- MURO, A.F., CAPUTI, M., PARIYARATH, R., PAGANI, F., BURATTI, E., & BARALLE, F.E. 1999. Regulation of Fibronectin EDA Exon Alternative Splicing: Possible Role of RNA Secondary Structure for Enhancer Display. *Mol. Cell. Biol.*, **19**(4), 2657–2671. [86](#)
- NAKIELNY, S., SIOMI, M.C., SIOMI, H., MICHAEL, W., POLLARD, V., & DREYFUSS, G. 1996. Transportin: Nuclear Transport Receptor of a Novel Nuclear Protein Import Pathway. *Exp. Cell Res.*, **229**, 261–266. [83](#)

- NEWMAN, A. 1994. Small nuclear RNAs and pre-mRNA splicing. *Curr. Biol.*, **6**, 360–367. Review. 1
- NILSEN, T.W. 1994. RNA-RNA Interactions in the Spliceosome: Unraveling the ties that bind. *Cell*, **78**, 1–4. Review. 2
- OKAZAKI, K., OKAZAKI, N., KUME, K., JINNO, S., TANAKA, K., & H.OKAYAMA. 1990. High-frequency transformation method and library transducing vectors for cloning mammalian sDNAs by trans-complementation of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res.*, **18**, 6485–6489. 20
- PAPOUTSOPOULOU, S., NIKOLAKAKI, E., AND V. KRUF, G. CHALEPAKIS, CHEVAILIER, P., & GIANNAKOUROS, T. 1999. SR protein specific kinase 1 is highly expressed in testis and phosphorylates protamine 1. *Nucleic Acids Res.*, **27**(14), 2972–2980. 85
- POPIELARZ, M., CAVALOC, Y., MATTEI, M.G., GATTONI, R., & STEVENIN, J. 1995. The Gene encoding Human Splicing Factor 9G8. *J. Biol. Chem.*, **270**(30), 17830–17835. 6
- PORTER, G., BRENNWALD, P., & WISE, J.A. 1990. U1 Small nuclear RNA from *Schizosaccharomyces pombe* has Unique and Conserved Features and Is Encoded by an Essential Single-Copy Gene. *Mol. Cell. Biol.*, **10**(6), 2874–2881. 6
- POTASHKIN, J., LI, R., & FRENDEWEY, D. 1993. Pre-mRNA splicing mutants of *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J.*, **8**, 551–559. 6
- PRABHALA, G., ROSENBERG, G.H., & KAEUFER, N.F. 1992. Architectural features of pre-mRNA Introns in the Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast*, **8**, 171–182. 6, 42, 62, 72
- PRASAD, J., COLWILL, K., PAWSON, T., & MANLEY, J.L. 1999. The protein kinase Clk/Sty directly modulates SR protein activity: Both hyper- and hypophosphorylation inhibit splicing. *Mol. Cell. Biol.*, **19**(10), 6991–7000. 5, 83, 85
- REED, R. 1996. Initial splice site recognition and pairing during pre-mRNA splicing. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **6**, 215–220. Review. 1
- RING, H.Z., & LIS, J.T. 1994. The SR protein B52/SRp55 is essential for *Drosophila* development. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 7499–7506. 4, 64, 84
- ROMFO, C.M., LAKHE-REDDY, S., & WISE, J.A. 1999. Molecular genetic analysis of U2AF59 in *Schizosaccharomyces pombe*: Differential sensitivity of introns to mutational inactivation. *RNA*, **5**, 49–65. 6
- ROSE, A.B., & BROACH, J.R. 1990. Propagation and expression of cloned genes in yeast: 2- μ m circle based vectors. *Methods Enzymol.*, **185**, 234–279. 44
- ROSENBERG, G.H., ALAHARI, S.K., & KAEUFER, N.F. 1991. *prp4* from *Schizosaccharomyces pombe*, a mutant deficient in pre-mRNA Splicing isolated using genes containing artificial Introns. *Mol. Gen. Genet.*, **226**, 305–309. 7
- RUSKIN, B., ZAMORE, P.D., & GREEN, M.R. 1988. A factor, U2AF, is required for U2 snRNP binding and splicing complex assembly. *Cell*, **52**, 207–219. 3
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., & MANIATIS, T. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd edn. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 11
- SANGER, F., NICKLEN, S., & COULSON, A.R. 1977. DNA Sequencing with Chain-terminating Inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5463–5467. 31

- SCHAAL, T.D., & MANIATIS, T. 1999. Multiple distinct splicing enhancers in the protein-coding sequences of a constitutively spliced pre-mRNA. *Mol. Cell. Biol.*, **19**(1), 261–273. [4](#), [72](#)
- SCHMIDT, WIEBKE. 1998. *Nachweis intronhaltiger mRNAs des srp2 Gens aus Schizosaccharomyces pombe: Wird dieses Gen alternativ gespleißt?* Studienarbeit, Institut für Genetik, TU Braunschweig. [75](#)
- SCREATON, G.R., CACERES, J.F., MAYEDA, A., BELL, M.V., PLEBANSKI, M., JACKSON, D.G., BELL, J.I., & KRAINER, A.R. 1995. Identification and characterization of three members of the human SR family of pre-mRNA splicing factors. *EMBO J.*, **14**(17), 4336–4349. [3](#), [73](#), [82](#), [85](#)
- SHARP, P.A. 1994. Split Genes and RNA Splicing. *Cell*, **77**, 805–815. [2](#)
- SOUTHERN, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, **85**, 503–17. [30](#)
- SPINGOLA, M., GRATE, L., HAUSSLER, D., & ARES, M. 1999. Genome-wide bioinformatic and molecular analysis of introns in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA*, **5**, 221–234. [6](#)
- STAKNIS, D., & REED, R. 1994. SR proteins promote the first specific recognition of pre-mRNA and are present together with the U1 small nuclear ribonucleoprotein particle in a general splicing enhancer complex. *Mol. Cell. Biol.*, **14**(11), 7670–7682. [4](#)
- SUN, J.S., & MANLEY, J.L. 1995. A novel U2-U6 snRNA structure is necessary for mammalian mRNA splicing. *Genes Dev.*, **9**, 843–854. [2](#)
- TACKE, R., & MANLEY, J.L. 1995. The human splicing factors ASF/SF2 and SC35 possess distinct, functionally significant RNA binding specificities. *EMBO J.*, **14**(14), 3540–3551. [81](#)
- TACKE, R., & MANLEY, J.L. 1999. Determinants of SR protein specificity. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **11**(3), 358–362. [81](#), [83](#)
- TANG, Z., YANAGIDA, M., & LIN, R.J. 1998. Fission yeast mitotic regulator Dsk1 is an SR protein-specific kinase. *J. Biol. Chem.*, **273**(10), 5963–5369. [7](#), [83](#)
- TANG, Z., KUO, T., & LIN, R.J. 1999a. Dsk1 Regulates Interactions and Functions of *S.pombe* Domain containing Proteins. *Page 259 of: The first international fission yeast meeting, September 25th – September 30th*. University of Edinburgh, UK, Department of Molecular Biology, Beckman Research Institute of the City of Hope, Duarte, CA 91010, USA. [83](#)
- TANG, Z., MANDEL, L., YEAN, S.L., SHEN, J., LIN, C., & LIN, R.J. 1999b. Two Protein Kinases in the SR Networks of *S.pombe*. *Page 142 of: The first international fission yeast meeting, September 25th – September 30th*. University of Edinburgh, UK, Department of Molecular Biology, Beckman Research Institute of the City of Hope, Duarte, CA 91010, USA. [83](#)
- TARN, W.Y., & STEITZ, J.A. 1994. SR proteins can compensate for the loss of U1 snRNP functions *in vitro*. *Genes Dev.*, **8**(22), 2707–2717. [4](#)
- UMEN, J.G., & GUTHRIE, C. 1995. A novel role for a U5 snRNP protein in 3' splice site selection. *Genes Dev.*, **9**, 855–868. [2](#)
- URUSHIYAMA, S., TANI, T., & OSHIMA, Y. 1996. Isolation of novel pre-mRNA splicing mutants of *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Gen. Genet.*, **253**, 118–127. [6](#)

- VALCAREL, J., & GREEN, M.R. 1996. The SR-Protein Family: pleiotropic functions in pre-mRNA Splicing. *Trends Biochem. Sci.*, **21**(Aug.), 296–301. Review. [3](#)
- VALCAREL, J., GAUR, R.K., SINGH, R., & GREEN, M.R. 1996. Interaction of U2AF⁶⁵ RS Region with Pre-mRNA of Branch Point and Promotion Base Pairing with U2 snRNA. *Science*, **273**, 1706–1709. [3](#)
- WANG, C., CHUA, K., SEGHEZZI, W., LEES, E., GOZANI, O., & REED, R. 1998. Phosphorylation of spliceosomal protein SAP 155 coupled with splicing catalysis. *Genes Dev.*, **12**, 1409–1414. [83](#)
- WANG, J., TAKAGAKI, Y., & MANLEY, J.L. 1996. Targeted Disruption of an essential vertebrate gene: ASF/SF2 is required for cell viability. *Genes Dev.*, **10**, 2588–2599. [4](#)
- WILL, C.L., & LÜHRMANN, R. 1997. Protein functions in pre-mRNA splicing. *Curr Opin Cell Biol*, **9**, 320–328. Review. [3](#)
- WITT, I. 1993. *Analyse der Promotoren ribosomaler Proteingene aus S.pombe. Charakterisierung des Elementes CAGTCACA als ein TATA-Box Äquivalent*. Ph.D. thesis, Freie Universität Berlin. [34](#)
- WOODS, A., SHERWIN, T., SASSE, R., MACRAE, T.H., BAINES, A.J., & GULL, K. 1989. Definition of individual components within the cytoskeleton of *Trypanosoma brucei* by a library of monoclonal antibodies. *J. Cell Sci.*, **93**, 491–500. [24](#)
- WU, J., & MANLEY, J.L. 1991. Base pairing between U2 and U6 snRNAs is necessary for Splicing of a mammalian pre-mRNA. *Nature*, **352**, 818–821. [2](#)
- WU, Y.J., & MANIATIS, T. 1993. Specific Interactions between Proteins Implicated in Splice Site Selection and Regulated Alternative Splicing. *Cell*, **75**, 1061–1070. [4](#), [83](#)
- XIAO, S.H., & MANLEY, J.L. 1996. Phosphorylation of the ASF/SF2 RS domain affects both protein-protein and protein-RNA interactions and is necessary for splicing. *Genes Dev.*, **11**, 334–344. [85](#)
- YANISCH-PERRON, C., VIEIRA, J., & MESSING, J. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, **33**, 103–119. [13](#)
- YUE, B.G., & AKUSJAEVI, G. 1999. A downstream splicing enhancer is essential for in vitro pre-mRNA splicing. *FEBS Letters*, **451**, 10–14. [86](#)
- ZAHLER, A.M., & ROTH, M.B. 1995. Distinct functions of SR proteins in recruitment of U1 small nuclear ribonucleoprotein to alternative 5' splice sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 2642–2646. [4](#)
- ZAHLER, A.M., LANE, W.S., STOLK, J.A., & ROTH, M.B. 1992. SR proteins: a conserved family of pre-mRNA splicing factors. *Genes Dev.*, **6**, 837–847. [3](#), [4](#), [7](#)
- ZHENG, Z.M., HUYNEN, M., & BAKER, C.C. 1998. A pyrimidine-rich exonic splicing suppressor binds multiple RNA splicing factors and inhibits spliceosomal assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**(Nov.), 14088–14093. [86](#)
- ZIEVE, G.W., & SAUTERER, R.A. 1990. Cell Biology of the snRNP Particles. *Biochem. Mol. Biol.*, **25**, 1–46. Review. [1](#)
- ZUO, P., & MANLEY, J.L. 1994. The human Splicing factor ASF/SF2 can specifically recognize pre-mRNA 5' splice sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 3363–3367. [4](#)

7 Anhang

7.1 Sequenzen

7.1.1 Sequenz der *srp2* cDNA

Nukleinsäuresequenz der cDNA des *srp2* Gens von *S.pombe* (GenBank #:AF012278).

1	ATGTCGGAGA	CTAGATTGTT	TGTTGGCCGT	ATTCCTCCTC	AAGCG	45
46	ACTCGCGAGG	ATATGATGGA	TTTTTTTAAA	GGTTACGGTC	AAATC	90
91	CTTGATTGCA	AGCTGATGAA	TGGATTGGC	TTTGTGAGG	TTGAA	135
136	GACGCTCGCG	ATGCTCGTGA	TATCGTAAAT	GACTTTCAGG	GCAAA	180
181	GAGTTTATGG	GCAGCCGTAT	TGTTGTAGAA	CCTGCTCGCG	GTGAA	225
226	AGAAGAAGAA	GAGAGAACTT	TAGAGAAAAGT	GCTGCTTCTA	AATAC	270
271	CCCCGTCCCC	GTCGCACCGG	TTTCCGTTTG	ATTGTGGAAA	ATCTC	315
316	TCAGAAAGATG	TCAGTTGGCA	GGACCTGAAG	GATGTAATGC	GTAAA	360
361	GCTGGTGAAC	CCACTTTCAC	AGATGCTCAC	CGTGAAAACC	CTGGT	405
406	GCTGGTGTG	TTGAATTTTC	TACTGAAGAG	GATATGAGAA	ACGCT	450
451	TTGACGAGCC	TTAATGGTGA	AGTCATTAAA	GGCCAAGCAG	TTACT	495
496	TTACGCGAAG	ACCCTGATGC	CGCTAATGAG	CCCCTTCCCG	AAGTA	540
541	CCCTCCCGCT	TCCGTTACAG	TTCTCCACCT	GCTCGCCGTC	GTTAT	585
586	CGTGATGATT	ATCGTAGAGG	AGGCGATTAC	CGTCGTGACG	CTTAT	630
631	CGTCCCGGCA	GAGATGATGA	ACGTCGTAT	GCTCCTCGTG	GTGAA	675
676	TACAGGCGTA	ATAATCGTGA	TGAATACCGT	CGTGGTGGTC	GCGAT	720
721	GAGTATAGAC	GTAATTCCAG	AAGTGATTAT	CGTCGTCTC	ATGAT	765
766	GATGAGTATC	GTCGTCCTAG	AGGTGATGAA	TATCGCCCTG	GACGA	810
811	GACGAATACC	GTCGTTCTCG	TGATGATGGA	CGCCCTTCCC	ATGAT	855
856	GATGAGTATC	GACGTGACGC	TTATAGCCGT	AGTCCTTCTC	CTAGA	900
901	CGTGATAGAG	AAGAGAATCG	CTCCCTGCC	TATGAAGGTT	CCAAA	945
946	TCCTATTTCAG	CTGCTCCTGA	AGCATCAATG	GAGTCATCTG	CTCCC	990
991	ACTGAATCAT	ATGACAAAACC	TGCTGCTTCG	GAAGAAACAAC	AGCCT	1035
1036	TTGCAAAACC	ATTCTGATGT	AGGTAACGGT	AGCGCTGAAG	GACAG	1080
1081	GTCGCTGCTG	AATGGTAA				1098

7.1.2 Sequenz des *srp2* Gens

Nukleinsäuresequenz des *srp2* Gens von *S.pombe*. Die Exons des *srp2* Gens befinden sich an den Positionen 356–398 (Exon 1), 442–528 (Exon 2), 585–621 (Exon 3), 662–667 (Exon 4), 720–744 (Exon 5), 794–862 (Exon 6), 1053–1122 (Exon 7), 1211–1284 (Exon 8), 1329–1429 (Exon 9) und 1484–2071 (Exon 10).

1	CTAGCTCCTT	AATCATGATT	AATTAACTT	ACAGTATCCC	GTCTGA	45
46	TGAAATATATC	ATCGCCATCT	TGATCCATTA	ATTAATTATT	ATCTA	90
91	ACCTTCTTAA	TCAATTCAAT	AGACACTCTG	AAGTATGGTT	GATAG	135
136	TTACTCAGAT	TTCATTTATA	CAATATTAGG	AAAAAGTGTG	GACCG	180
181	ATGAATGCAT	AAAATCGTTA	GACAAGGTTT	GATTAAACACC	ATCTC	225
226	TTTTAATTG	ATTTTATATT	TTATTTCATT	ATCTTATATT	TTGTA	270
271	ACTTGGGTTT	CGCCGGCCTT	CAGCCTCAAG	ACTGCCGACT	GAGGG	315
316	TCGAACTTCA	CCCAGCAAGA	ACCAACTACA	CCAAAAAAA	ATGTC	360
361	GGAGACTAGA	TTGTTTGTG	GCCGTATTCC	TCCTCAAGGT	TTGTA	405
406	ACTAAATAAT	GTAAATAGTA	TTTTAACAAA	AATTTAGCGA	CTCGC	450
451	GAGGATATGA	TGGATTTTTT	TAAAGGTTAC	GGTCAAATCC	TTGAT	495

496	TGCAAGCTGA	TGAATGGATT	TGGCTTTGTT	GAGGTAAATA	AAACC	540
541	ATTAGCCTTC	TTTTTGTAAT	CCCTATGTGA	CTAACTTGAT	GTAGG	585
586	TTGAAGACGC	TCGCGATGCT	CGTGATATCG	TAAATGGTAC	GTTCA	630
631	TACCATCTTA	AAACTTTTGC	TAACAGTTTA	GACTTTCGTA	TGCTT	675
676	CAAAGGTTTA	ATATTCGACT	TTATTTACTA	ATCTTATAAA	AAAGA	720
721	GGGCAAAGAG	TTTATGGGCA	GCCGGTAAGT	CAATACATTA	TGAAT	765
766	TTAGATTAAA	ATATGCTAAT	GTTCGAAGTA	TTGTTGTAGA	ACCTG	810
811	CTCGCGGTGA	AAGAAGAAGA	AGAGAGAACT	TTAGAGAAAAG	TGCTG	855
856	CTTCTAAGTA	CGTTGTTACG	TTTCCATTAA	TATGTGATTA	GTGGG	900
901	CGATTTGGCA	TTGCACGCGA	TTGCTGGTTC	TAACGATTTT	GTTCA	945
946	CTTCACATGT	GAATCAGCTC	TGAGTAGTGA	CTATATACGG	TGTTA	990
991	TCGCTTGCAA	AATCGCATTG	TCCTATAAAA	ATTACGGCAA	TATTT	1035
1036	TTATACTAAC	GTATCAGATA	CCCCCGTCCC	CGTCGCACCG	GTTTC	1080
1081	CGTTTGATTG	TGGAAAATCT	CTCAGAAGAT	GTCAGTTGGC	AGGTA	1125
1126	AGACAATTTT	ATACATTTAA	TGACCTTTGC	GTCAATGCAT	GATTT	1170
1171	TTTTTCATATA	TCTATATTTT	AGTGTTAACA	CTTTTCATAG	GACCT	1215
1216	GAAGGATGTA	ATGCGTAAAG	CTGGTGAACC	CACTTTCACA	GATGC	1260
1261	TCACCGTGAA	AACCCGGTGG	CTGGGTAAAGT	TTCTACTTTG	ATCAT	1305
1306	TTTTTCACCT	AACTTTAATG	CAGTGTTGTT	GAATTTTCTA	CTGAA	1350
1351	GAGGATATGA	GAAACGCTTT	GACGAGCCTT	AATGGTGAAG	TCATT	1395
1396	AAAGGCCAAG	CAGTTACTTT	ACGCGAAGAC	CCTGTAAGCA	TCTAA	1440
1441	TCTTTTTTAA	AGATCCTTGC	GTAAATTTTC	TAACGATTAG	CAGGA	1485
1486	TGCCGCTAAT	GAGCCCTTTC	CCGAAGTACC	CTCCCGCTTC	CGTTC	1530
1531	ACGTTCTCCA	CCTGCTCGCC	GTCGTTATCG	TGATGATTAT	CGTAG	1575
1576	AGGAGGCGAT	TACCGTCGTG	ACGCTTATCG	TCCCGGCAGA	GATGA	1620
1621	TGAACGTCGT	TATGCTCCTC	GTGGTGAATA	CAGGCGTAAT	AATCG	1665
1666	TGATGAATAC	CGTCGTGGTG	GTGCGGATGA	GTATAGACGT	AATTC	1710
1711	CAGAAGTGAT	TATCGTCGTC	CTCATGATGA	TGAGTATCGT	CGTCC	1755
1756	TAGAGGTGAT	GAATATCGCC	CTGGACGAGA	CGAATACCGT	CGTTC	1800
1801	TCGTGATGAT	GGACGCCCTT	CCCATGATGA	TGAGTATCGA	CGTGA	1845
1846	CGCTTATAGC	CGTAGTCCTT	CTCCTAGACG	TGATAGAGAA	GAGAA	1890
1891	TCGCTCCCCT	GCCTATGAAG	GTTCCAAATC	CTATTCAGCT	GCTCC	1935
1936	TGAAGCATCA	ATGGAGTCAT	CTGCTCCAC	TGAATCATAT	GACAA	1980
1981	ACCTGCTGCT	TCGGAAGAAC	AACAGCCTTT	GCAAAACCAT	TCTGA	2025
2026	TGTAGGTAAC	GGTAGCGCTG	AAGGACAGGT	CGCTGCTGAA	TGGTA	2070
2071	AACATAGAAA	TTTTTCCTTT	GGTAAACTAT	TTTTTAGTGT	CTGCT	2115
2116	TACTAGATTT	TCCTGTCATA	TGTCTGTGGT	CTTAATATCC	TTTGT	2160
2161	CTGTGATGTA	TTTGAGTATG	AATTTATCTC	TCTTTATTTG	CGATT	2205
2206	TCCTTTCTTA	CGATCAAGAA	TGAAAGGAAT	GTGTAATTTT	TAGTG	2250
2251	TAGTTCGGGA	TTTTTGCCGC	GTATTTGTCA	TTCTTTATCA	TTTGG	2295
2296	ATGGATTTTG	GTTGTTTTTT	TTTGGTTGTT	GTTCTTAATG	AAGTG	2340
2341	AACGCCCCGA	GAAAAGTTAG	TTGTTGGAGT	ATGGGTGTTT	AAAGG	2385
2386	GTATATAATT	TCACATAGTT	GTTTGATGAG	AGTGACCACT	TTAAC	2430
2431	TCTTGCCAGT	CTTGATTTCC	AACCCATTAA	TGCCCAGAAA	AAAAT	2475
2476	AGGCTCGAAA	CTTTAGTAGG	TGATAAATTT	TGATATGGTT	GTATA	2520
2521	CCTTTGGCGG	TGTCTTAATA	TTTAGCTTAA	ATGAGCCAGA	ATTTT	2565
2566	GAATTTGACC	GCCCCATAAA				2585

Lebenslauf

Name : Martin Lützelberger

Geburtstag : 06.05.1970

Geburtsort: : Helmstedt

Familienstand : ledig

Staatsangehörigkeit : deutsch

1976–1980 : Grundschule, „Im Heidgarten“, Vorsfelde

1980–1982 : Orientierungsstufe, Schulzentrum Vorsfelde

1982–1986 : Realschule, Schulzentrum Vorsfelde

1986–1989 : Gymnasium, Kreuzheide Wolfsburg

1989 : Abitur

1989–1990 : Wehrdienst

1990–1995 : Studium der Biologie an der Technischen Universität
Braunschweig

1992 : Vordiplom in Biologie

1996 : Abschluß des Studienfachs Biologie mit dem Diplom.
Thema der Diplomarbeit: Isolierung und Charakterisierung einer
Säuger-cDNA mit Homologie zum *prp4* Gen von
Schizosaccharomyces pombe

1996 : Beginn der Dissertation am Institut für Genetik der
Technischen Universität Braunschweig